



INDIAN AGRICULTURAL  
RESEARCH INSTITUTE, NEW DELHI.

**I. A. R. I. 6.**

MGIPC—SI —6 AR/54—7-7-54—10,000.







# ENZYMOLOGIA

ACTA BIOCATALYTICA

EDITORES:

K. LINDERSTRØM-LANG et H. G. K. WESTENBRINK

KØBENHAVN

AMSTERDAM



VOLUMEN X

## **VOLUMEN X.**

**Fasc. 1, pag. 1—96 , edit. 28. X. 1941.**  
**„ 2, „ 97—160, „ 29. XII. 1941.**  
**„ 3, „ 161—256, „ 30. IV. 1942.**  
**„ 4-6, „ 257—372, „ 15. VI. 1942**

**PRINTED IN HOLLAND**  
**N.V. Drukkerij v/h L. E. Bosch & Zoon, Utrecht.**

# TABLE DES MATIÈRES: INHALT: CONTENTS: INDICE:

	Pag.
<b>J. Runnström, R. Gurney and E. Sperber</b> (Wenner Grens Inst. for Exper. Biol., Stockholm): On protection against the inhibitory action of fluoride (With 23 fig.) . . . . .	1
<b>D. Müller</b> (Pflanzenphysiol. Labor. der Tierarztl. und Landw. Hochsch., Kopenhagen): Über die Glucosedehydrasen . . . . .	40
<b>Z. M. Bacq</b> (Labor. de Physiol. animale de l'Univ. de Liège): Sur une relation entre l'inhibition de glycolyse et l'action vésicante (Avec 1 fig.) . . . . .	48
<b>T. Yoshida and K. Yamafuji</b> (Inst. f. Biochem. am Kaiserl. Inst. f. Zuckerforsch., Tainan, Japan): Die Bestimmung der Fructose in Gegenwart von Saccharose und Glucose . . . . .	61
<b>L. Vandendriessche</b> (Labor. de Chim. physiol., Ec. Vétér., Univ. Gand): L'action biochimique des dinitrodérivés sur le métabolisme des cellules de levure. . . . .	69
<b>P. Marquardt</b> (Pharmaz. Abt. der Byk-Guldenwerke, Oranienburg bei Berlin): Über den Abbau der Bernsteinsäure vermittels Chinonkatalyse im Modell und seine Hemmung durch Dimedon (Mit 2 Fig.) . . . . .	79
<b>H. Lineweaver and S. Schwitter</b> (Enzyme Res. Labor., Bureau of Agr. Chem. and Eng., U.S.D.A.): Some properties of crystalline papain (With 5 fig.) . . . . .	81
<b>J. Brachet</b> (Labor. de Morphol. animale, Fac. des Sc. de l'Univ. de Bruxelles): La détection histochimique et le microdosage des acides pentosenucléiques (Avec 1 fig.) . . . . .	87
<b>K. Linderstrøm-Lang and C. F. Jacobsen</b> (Carlsberg Laboratory, Copenhagen): The contraction accompanying enzymatic breakdown of proteins (With 17 fig.) . . . . .	97
<b>I. G. Mensorow</b> (Labor. pour Enzymol. de la Sect. de Chimie physiol. de l'Inst. Gorky pour Méd. expér. VIEM, Moscou): Sur la nature des plastéines. . . . .	127
<b>G. A. Overbeek and C. C. Polder</b> (Dep. of Pharmacol. of the Univ. of Leiden, Holland): Some observations on the oxygen consumption of tissue pulp (With 8 fig.) . . . . .	133
<b>F. Haurowitz</b> (Mediz.-chem. Inst. der Univ. Istanbul): Katalytische Oxydation von Sulfiden durch Häm in oder Hämoglobin. . . . .	141
<b>H. G. K. Westenbrink and J. Goudsmit</b> (Labor. of Physiol. Chem., Univ. of Amsterdam): Investigations on the aneurin metabolism of the frog, compared to that of the rat (With 3 fig.) . . . . .	146
<b>M. Yoshioka</b> (Utzino-Labor. des Inst. für chem. Forschung an der Kais. Univ. Kyoto): Über die Acylase der Mauseleber. . . . .	154
<b>G. Ågren</b> (Biochem. Dep., Karolinska Inst., Stockholm): The secretion of proteolytic enzymes into the duodenum of the cat after secretin injections . . . . .	161
<b>F. L. Breusch</b> (Inst. f. biol. u. med. Chemie der Univ. Istanbul): Die zwei Hauptsysteme der Atmung im Warmblütergewebe (Mit 8 Fig.) . . . . .	165
<b>L. Gorini</b> (Labor. di Ric. della S. A. Boniscontro e Gazzone, Torino): Sulle proteasi degli acido-proteoliti . . . . .	192
<b>G. Hamoir</b> (Labor. de Biol. gén. de la Fac. des Sc. de l'Univ. de Liège): La cinétique de l' $\alpha$ -amylase du malt (Avec 5 fig.) . . . . .	203
<b>H. G. K. Westenbrink and D. A. van Dorp</b> (Labor. of Physiol. Chem., Univ. of Amsterdam): Some further experiments on the inhibition of "top-yeast phosphatase" by aneurin. . . . .	212
<b>W. Froentjes</b> (Anorg. chem. Labor., Univ., Groningen (Holland)): Über den Einfluss von Phenylalkylaminen auf die Sauerstoffaufnahme von Hirngewebe. . . . .	216
<b>M. Florkin, R. Crismer, G. Duchateau et R. Houet</b> (Labor. de Chimie physiol. de l'Univ. de Liège): Sur les $\beta$ -glucuronides et la $\beta$ -glucuronidase (Avec 4 fig.) . . . . .	220
<b>J. Courtois et P. Biget</b> (Labor. de Chimie biol. et Hydrol. de la Faculté de Pharmacie de Paris): Existe-t-il une mutase des glycérophosphates? . . . . .	234
<b>J. Roche et M. T. Simonot</b> (Labor. de Chimie biol., Fac. de Médecine et Pharmacie, Marseille): Activité phosphatasique des os et mécanisme de production du rachitisme expérimental (Avec 3 fig.) . . . . .	239
<b>L. Massart et L. Vandendriessche</b> (Labor. de Chim. physiol., Ec. Vétér., Univ. Gand): Influence des dinitrophénols sur la pyruvo- et la succinodéhydrogénase. . . . .	244

	Pag.
<b>H. Theorell</b> (Biochem. Inst. of the Medical Nobel Institute, Stockholm): Crystalline peroxidase (Preliminary communication) .....	250
<b>S. de Jong</b> (Labor. of „Het Nederlandsch Instituut voor Volksvoeding", Amsterdam): Aneurin in cow's and goat's milk (Preliminary communication).....	258
<b>H. G. K. Westenbrink and H. Veldman</b> (Labor. of Physiol. Chem., Univ. of Amsterdam): On the synthesis and decomposition of aneurinpyrophosphate by living yeast (Preliminary communication) .....	255

From the Biophysical Research Group under the direction of L. S. ORNSTEIN †, Utrecht, and of A. J. KLUYVER, Delft:

<b>E. C. Wassink</b> : On the ratio between the uptake of carbon dioxide and of the hydrogen donor in purple sulfur bacteria (With 10 fig.).....	257
<b>E. Katz, E. C. Wassink and R. Dorrestein</b> : On some methodical problems in the study of photosynthesis of unicellular organisms (With 11 fig.).....	269
<b>E. C. Wassink, E. Katz and R. Dorrestein</b> : On photosynthesis and fluorescence of bacteriochlorophyll in <i>Thiorhodaceae</i> (With 89 fig.).....	285
<b>R. Dorrestein, E. C. Wassink and E. Katz</b> : Theoretical considerations concerning the relation between photosynthesis and fluorescence of bacteriochlorophyll in purple sulfur bacteria. with an outlook on the comparative physiology of photosynthesis (With 8 fig.).....	355

#### PLANCHES:      TAFELN:      PLATES:      TAVOLE:

	pag.
I. (Theorell) .....	250/251

#### Erratum :

Figure 9, page 118, in the article: "The contraction accompanying enzymatic breakdown of proteins" by K. LINDERSTRØM-LANG and C. F. JACOBSEN, has been placed upside-down. It should be turned over 180°.

## Index Autorum.

---

- ÅGREN, G. 161.  
BACQ, Z. M. 48.  
BIGET, P., vide J. COURTOIS 284.  
BRACHET, J. 87.  
BREUSCH, F. L. 165.  
COURTOIS, J. et P. BIGET 284.  
CRISMER, R., vide M. FLORKIN 220.  
DORP, D. A. VAN, vide H. G. K. WESTENBRINK 212.  
DORRESTEIN, R., vide E. KATZ 269.  
DORRESTEIN, R., vide E. C. WASSINK 285.  
DORRESTEIN, R., E. C. WASSINK and E. KATZ 355.  
DUCHATEAU, G., vide M. FLORKIN 220.  
FLORKIN, M., R. CRISMER, G. DUCHATEAU et R. HOUET 220.  
FROENTJES, W. 216.  
GORINI, L. 192.  
GOUDSMIT, J., vide H. G. K. WESTENBRINK 146.  
GURNEY, R., vide J. RUNNSTRØM 1.  
HAMOIR, G. 203.  
HAUROWITZ, F. 141.  
HOUE, R., vide M. FLORKIN 220.  
JACOBSEN, C. F., vide K. LINDERSTRØM-LANG 97.  
JONG, S. DE 253.  
KATZ, E., E. C. WASSINK and R. DORRESTEIN 269.  
KATZ, E., vide E. C. WASSINK 285.  
KATZ, E., vide R. DORRESTEIN 355.  
LINEWEAVER, H. and S. SCHWIMMER 81.  
LINDERSTRØM-LANG, K. and C. F. JACOBSEN 97.  
MARQUARDT, P. 79.  
MASSART, L. et L. VANDENDRIESSCHE 244.  
MENSOROW, I. G. 127.  
MÜLLER, D. 40.  
OVERBEEK, G. A. and C. C. POLDER 133.  
ROCHE, J. et M. T. SIMONOT 239.  
RUNNSTRØM, J., R. GURNEY and E. SPERBER 1.  
SCHWIMMER, S., vide H. LINEWEAVER 81.  
SIMONOT, M. T., vide J. ROCHE 239.  
SPERBER, E., vide J. RUNNSTRØM 1.  
THEORELL, H. 250.  
VANDENDRIESSCHE, L. 69.  
VANDENDRIESSCHE, L., vide L. MASSART 244.  
VELDMAN, H., vide H. G. K. WESTENBRINK 255.  
WASSINK, E. C. 257.  
WASSINK, E. C., E. KATZ and R. DORRESTEIN 285.  
WASSINK, E. C., vide R. DORRESTEIN 355.  
WASSINK, E. C., vide E. KATZ 269.  
WESTENBRINK, H. G. K. and D. A. VAN DORP 212.  
WESTENBRINK, H. G. K. and J. GOUDSMIT 146.  
WESTENBRINK, H. G. K. and H. VELDMAN 255.  
YAMAFUJI, K., vide T. YOSHIDA 61.  
YOSHIDA, T. und K. YAMAFUJI 61.  
YOSHIOKA, M. 154.
-



# On protection against the inhibitory action of fluoride

## Protection conferred by substrate in the respiration and fermentation of bakers yeast

BY

JOHN RUNNSTRÖM, RONALD GURNEY AND ERIK SPERBER

(*Wenner Grens-Inst. for Exper. Biol., Stockholm*)

(With 23 figures)

(28.I.41.)

*„Nicht die Konstanz des natürlichen Enzymsystems ist das Gesetzmässige, sondern seine Veränderlichkeit“.*

WILLSTÄTTER and ROHDEWALD 1).

### TABLE OF CONTENTS.

	P.
I. Introduction . . . . .	1
II. Methods and notation . . . . .	2
III. Experimental part . . . . .	4
1) Fluoride added before and after the substrate . . . . .	4
2) The protection against fluoride in different concentrations of glucose . . . . .	8
3) Protection in starved and restored yeast . . . . .	10
4) Protection in yeast pre-treated with glucose . . . . .	13
5) Protection conferred by other substrates than glucose . . . . .	16
6) The protection of fermentation under anaerobic conditions . . . . .	19
7) Influence of pre-treatment on the inhibition of the anaerobic fermentation by fluoride added before the glucose . . . . .	21
8) Influence of pre-treatment on the inhibition of the anaerobic fermentation by fluoride added after the glucose . . . . .	24
9) Addition of alcohol does not protect the anaerobic fermentation . . . . .	26
10) Influence of yeast extract on the inhibition caused by fluoride . . . . .	27
11) Influence of ammonia on the inhibition caused by fluoride . . . . .	29
12) Inhibition by fluoride in the presence of cystein and thioglycollic acid . . . . .	31
IV. Discussion . . . . .	33
Summary . . . . .	38
References . . . . .	39

### I. Introduction.

In experiments on the inhibitory action of sodium fluoride on bakers yeast already reported (2) the fluoride was in general added to the yeast suspension before the substrate (glucose).

Respiration as well as fermentation were measured by means of the WARBURG manometric method. The main compartment of the vessel contained a yeast suspension in succinate-succinic acid buffer. The fluoride was added from a side-arm to the yeast suspension 10 minutes (in certain cases 0, 5, 20, 30 etc. minutes) before the glucose which was added from a second side-arm.

It was shown that the inhibition by fluoride is closely correlated to the strength of the endogenous respiration. When this is small or almost zero the inhibition of the oxidation and fermentation of added glucose by a certain concentration of fluoride (e.g. 25 m mol/l) is strong. The higher the endogenous respiration of the cells the lower the degree of inhibition of the breakdown of glucose conferred by fluoride added before the glucose. The inhibition of the oxidation of glucose found its expression in a lower slope of the sum curves of the oxygen consumption as a function of time. The degree of inhibition evidently is determined by the action of the fluoride during the period between the addition of fluoride and that of glucose.



For some experiments yeast with a lower endogenous respiration was prepared by starving the yeast. A suspension of yeast in distilled water was shaken for about sixteen hours in a water-bath at 25°, the cells were separated from the water on the centrifuge and resuspended in the buffer solution. This starved yeast was very sensitive to the fluoride which was added before the glucose. This was interpreted as due to an increased permeability to fluoride in the starved as compared with the „normal” yeast. The increase of the permeability in its turn would be caused by the absence of the endogenous respiration which in the starved yeasts is almost abolished. Miss M. MALM has in this laboratory made a thorough study of the penetration of NaF into the cells of bakers yeast (3). She was able to demonstrate by direct chemical estimations of the changes of fluoride content in the suspension medium that the fluoride in fact penetrates more rapidly into the starved cells than into the non-starved („normal”) cells. By further work, however, MALM arrives at the conclusion that not only the permeability but also an other variable factor, the „sensitivity” of the enzyme itself, determines the degree of inhibition caused by certain concentrations of fluoride.

It has been shown already (2) that the addition of glucose to some extent protects the cells against the inhibitory action of fluoride. This was evident already from the fact that the rate of respiration observed after a pre-treatment with fluoride usually remains nearly constant after the addition of glucose. It was supposed that the addition of glucose decreased the permeability of the cell surface to fluoride. It has been shown by MALM that the addition of glucose to the cells has no influence whatsoever on the rate of penetration of fluoride into the cells.

It is evident that the addition of the substrate acts directly on the molecules of the fluoride sensitive enzyme.

It is known (4-6) that a carrier in the respiratory system is attacked by fluoride. The potential of this carrier is in the neighbourhood of that of cytochrome b according to data presented by BOREI<sup>5, 6</sup>). The blocking of the carrier by fluoride gives rise to the inhibition of the respiration. It must be inferred that the carrier in question is rendered less sensitive to fluoride by the previous addition of glucose. Not only glucose but every oxidizable substrate seems to be endowed with the capacity of rendering the pertinent carrier less sensitive towards fluoride.

In the fermentation reaction chain likewise a link especially sensitive to fluoride is present. It is known that, in extracts from brewers' yeast or muscle, fluoride inhibits the enolase acting in the transition from 2-phosphoglyceric acid to phosphopyruvic acid, cf. MEYERHOF<sup>7</sup>). It seems likely that in the living cell also this is the point of attack of fluoride on the fermentation system. MALM<sup>3</sup>) has shown that the rate of penetration of fluoride into the cells is larger under anaerobic than under aerobic conditions. Addition of glucose is however ineffective in influencing the rate of penetration of fluoride, as under aerobic conditions. The addition of glucose, however, confers a considerable protection of the fermentation against the inhibitory action of fluoride. This must then be due to the fact that the addition of the glucose renders the pertinent link of the fermentation system less sensitive towards fluoride.

The fluoride sensitive enzymatic link acting in respiration and that acting in fermentation behave in a very similar way in respect to the inhibition conferred by fluoride. This is, however, not sufficient reason for assuming an identity of the enzymes in question. On the contrary, observations reported by BOREI<sup>6</sup>) speak rather decisively against an identity; some fundamental similarity must exist between the two enzymes forming the basis for the striking conformity of behaviour described in previous (2) and present work.

## II. Methods and notation.

The respiration and fermentation were measured by the WARBURG manometric method. As in the earlier experiments conical manometric flasks with two side-arms and one central cup were used. The substrate was added from one of the side arms, the sodium fluoride was added from the other. Both the substrate and the fluoride were introduced into the side-arms in the dissolved state, each solution in general having a volume of 0.3 ml. The concentrations given below in millimoles per litre (m mol/l) refer to the final concentrations after the addition of the content of the side-arms to the main compartment of the manometric flasks. Into this a certain quantity of a yeast suspension in

succinate-succinic acid buffer solution was measured. This buffer is designated in what follows as „s-s-buffer”. The pH was adjusted to 5. The final concentration of the s.s.-buffer was as in our previous experiments (2-4) 83 m.mol/l. The final volume of the samples (after the additions from the side-arms) amounted to 2,4 ml. The buffer concentration and the volume of the sample were the same in all the experiments carried out. In general no further mention of the buffer and the volume of the sample is made below in the special descriptions of the experiments. Each sample contained in the aerobic experiments generally 20 mg, in the anaerobic experiments generally 12 mg of yeast, wet weight (dry matter 27—28 %). When no special mention is made of the quantity of yeast per sample it amounted to 20 mg.

The oxygen consumption was measured as usual in an apparatus with 10 % KOH, 0,3 ml, added to the central cup, the diameter of which was great enough to allow a renewal of the surface by shaking (a small strip of filter paper was added to increase the absorbing surface).

When values for the production of carbon dioxide under aerobic conditions were required a second apparatus was added, in which KOH in the central cup was replaced by 0,3 ml water. From the pressure differences in this second apparatus and the oxygen consumption known from the readings of the apparatus with KOH the CO<sub>2</sub>-production was calculated in the usual way. At the pH prevailing no carbon dioxide was bound chemically in the course of the experiment.

Two parallel flasks, one containing KOH, the other not, are designated below as a pair. In the figures the numbers with which the curves are marked correspond to the numbers in the tables.

The respiratory quotient in the oxidative breakdown of glucose is unity and it has been shown (8) that this is also so in the living yeast cell. Thus a quantity of carbon dioxide is formed in respiration which is equal to the quantity of oxygen consumed. The surplus of carbon dioxide observed in the aerobic experiments with glucose corresponds to the aerobic fermentation.

In the anaerobic experiments the air was replaced by nitrogen passed over glowing copper. In more rigorous experiments the last traces of oxygen were removed either by placing a piece of white phosphorus in the central tube of the vessel or preferably by measuring 0,3 ml chromous chloride into the central cup.

The yeast used for the experiments was, as in previous work, kindly provided by the Swedish Yeast Factory Ltd. (Rotebro). The yeast delivered is quite free from contamination. The type chiefly used is designated in the factory as „D 5”. It has been cultivated under strong aeration and with continuous addition of the molasses as well as of the ammonium salts. The cells are in a resting stage; only few cells in division are observed. A distinct vacuole and distinct scattered metachromatic bodies are present in the cells.

In describing the procedure we shall use the expression „fluoride→glucose” to mean that in the experiment in question the fluoride has been added before the glucose, and the expression „glucose→fluoride” to mean that the glucose has been added before the fluoride. In the latter case the reading started generally immediately after the addition of glucose. In the curves an arrow marks the point of addition of fluoride. Sometimes in such experiments the readings started only after the addition of fluoride. After a short preliminary period of increasing rate a stationary initial rate is adopted by respiration or fermentation.

The stationary rate of respiration or fermentation has been determined graphically from the sum curves. The quotient: stationary rate of respiration or fermentation in presence of fluoride over the stationary rate in the corresponding control is designated below as  $n$ , the remaining respiration or fermentation;  $1-n$  is then the inhibition. This notation is in keeping with that used by WARBURG (9) in his work on the inhibition of respiration with carbon monoxide.

Owing to a decrease of the substrate concentration the sum curves break away earlier or later. After the break the slope of the curves is somewhat lower but may remain constant for some time. The rate corresponding to this is called the „final rate”.

If the fluoride is added before the glucose, the curves on the whole have the same form as the control curve (though the slopes are lower or sometimes higher than those of the control). The rates in general can be determined easily by graphical estimation of the slopes of the curves. If the fluoride is added after the substrate the rate at first is equal to that of the control. After a certain time however the curve separates from the control; the slope of the curve gradually changes until finally a rate is attained which may remain constant for some time. This is again the „final rate”. Neither the initial nor the final rate in this case is sufficient to give a full description of the curve.

It will be more convenient to give instead some measure of the average rate of respiration or fermentation during the experiment. For this purpose the area (A) included between each curve and the horizontal axis has been calculated \*).

The remaining respiration,  $n$ , is in these cases defined as the quotient: the A-value for a sample with fluoride present over the A-value for the corresponding control. Since, however, the value of  $n$  does not give any indication of the form of the curve, the reproduction of some of the numerous curves drawn during the course of this research seemed necessary. The experiments were interrupted arbitrarily after a certain time, generally after 180 minutes, sometimes after 210 or 240 minutes. At this time the rate of  $O_2$ -consumption or  $CO_2$ -production in several samples might still have been far from zero, while in other samples the  $O_2$ -consumption or  $CO_2$ -production already had stopped. It would have been more correct to continue the measurements until the processes studied in all the samples had arrived at zero and to draw the velocity diagrams instead of the sum curves and to calculate the areas A of the complete curves. This procedure would have been unpracticable. A further complication is the stimulation effect conferred by fluoride (2, 4). We think however that the mode of calculation adopted is sufficient for the purpose of giving a relative value of the degree of inhibition conferred by fluoride in different concentrations and under different circumstances.

The method of calculating A-values was adopted sometimes also for experiments of the type fluoride  $\rightarrow$  glucose, when the form of the curves made the statement of the stationary rates less significant.

In the tables it will be evident from the context on which basis the  $n$ -values have been calculated. The  $n$ -values are useful in giving some idea as to the relative degree of protection prevailing under different conditions. It has already been mentioned in § 1 that the yeast obtained from the factory is more resistant to attack by fluoride than this same yeast when it has been starved to some extent (2). We ascribe this greater resistance to „primary protection” of the enzyme. The protection conferred by added substrate we shall call „additional protection”. This notation has proved to be convenient in the discussion of the experiments. It seems probable according to results obtained by MALM<sup>3)</sup> that, in discussing the primary protection, the permeability of the cell surface to fluoride cannot be entirely neglected. Certain results to be described below speak, however, in favour of the view that permeability plays only a minor role as compared with the direct protection of the enzyme molecules by derivatives of substrates. These substrates may have been administered during the previous cultivation of the yeast (giving „primary protection”) or added in the course of the experiment (giving „additional protection”). In the starved yeast the degree of primary protection depends on the extent to which the yeast has been starved.

When different experiments are compared considerable variations are found in the range of concentrations of fluoride conferring inhibition. The prehistory of the cells is doubtless responsible for these variations as will be evident from experiments to be described below. The mass of yeast cells added does not essentially influence the degree of inhibition by fluoride within the range 5–50 mg wet weight per sample (2.4 ml). The results described in the experimental part of this paper are typical representatives of a greater number of experiments carried out.

### III. Experimental part.

1) **Fluoride added before and after the substrate.** The experiment shown in Table I and Fig. 1 and 2 demonstrates the considerable difference between the inhibitory action of fluoride according to whether it has been added before or after the substrate, glucose.

\*) For this calculation the well known SIMPSON formula has been used:  $A = \frac{h}{8} (y_0 + 4y_1 + 2y_2 + y_3n)$ ;  $h$  is in our calculations equal to 10 minutes,  $y_1, y_2, y_3$  and so on the consumption or production of  $O_2$  or  $CO_2$  respectively after 10, 20, 30 etc. minutes. If nothing is stated to the contrary the calculation of A is based in this paper on 18 values (duration of experiment 180 minutes). When as in some experiments only 17 values were available a 18th value was obtained by extrapolation.

TABLE I.  $t = 30^\circ$ .

No.	1	2	3	4	5
Glucose 23.2 mmol/l . . . . added after minutes . . . .	+ 0	+ 10	+ 10	+ 0	+ 0
Fluoride 37.5 mmol/l . . . . added after minutes . . . .	—	+ 0	—	+ 10	—
50 mmol/l . . . . . added after minutes . . . .	— —	— —	+ 0	— —	+ 10
Ia. A, $\mu\text{O}_2 \times \text{minutes}$ . . n	114,000 —	31,100 0.27	5,100 0.04	96,200 0.85	79,500 0.70
Ib. initial rate $\mu\text{O}_2/\text{minute}$ n	7.8 —	1.9 0.24	0.3 0.04	7.8 1.00	7.8 1.00
Ic. final rate $\mu\text{O}_2/\text{minute}$ n n <sub>1</sub>	6.7 0.86 —	1.7 0.22 0.25	0.2 0.03 0.08	3.8 0.49 0.57	1.1 0.14 0.21
II. A, $\mu\text{l}$ fermentation $\text{CO}_2$ $\times \text{minutes}$ . . . . . n	24,700 —	9,170 0.37	3,790 0.15	52,880 2.13	39,040 1.58

One pair of manometers corresponds to each column of the table. Thus both the  $\text{O}_2$  consumption (I) and the aerobic fermentation (II) can be calculated from the data available. The readings were started when the glucose was added and the measurements were continued over a period of 180 minutes. Fig. 1 gives the sum curves of the  $\text{O}_2$ -consumption. The arrow marks the time of addition of fluoride in samples 4 and 5. The slope of each curve at any point corresponds to the total activity of the enzyme at that time. In curve 2 the slope is nearly constant, showing that the activity of the enzyme changed little during three hours after the addition of glucose; the slope is, however, less than one-third of that of the control (Table I, Ib No. 2), showing that, in the ten minutes interval during which fluoride was present prior to the addition of glucose, the activity of the enzyme had fallen to less than one-third of its original value. When the same concentration of fluoride was added after the glucose (curve 4) the behaviour was quite different. The initial rate is practically equal to that of the control (Table I, Ib No. 4), but later the curve breaks as a function of the time. The same difference in this respect is found between curves 5 and 3 as between 4 and 2, of Table I, Ib and c.

In Table I, Ia, the values of A, the areas for each curve of Fig. 1, have been tabulated, cf. above p. 4; n is defined here as the area of a particular curve over the area of the control curve, while n in Table I, Ib and c is equal to the rate of respiration in a sample over the rate of respiration in the control. In Table I, Ic two different n-values are tabulated for each sample; n is calculated with the initial rate, n<sub>1</sub> with the final rate of the control as denominator. A represents, as pointed out above, an average rate, the

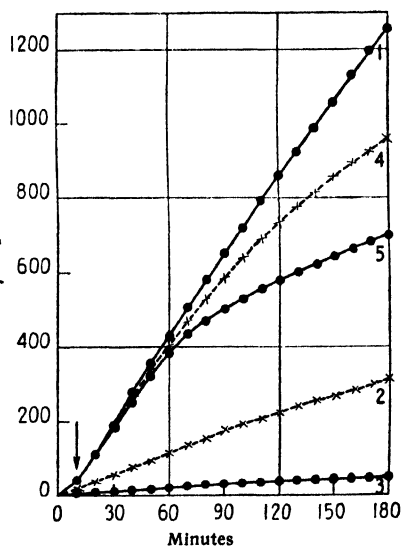


Fig. 1.

tabulation of which facilitates the comparison of the results with the different samples.

Although in No. 3, Table I, the fluoride concentration was only 33 per cent higher than No. 2, the inhibition is much greater. In both cases the fluoride was added 10 minutes before the glucose; and this experiment leaves it uncertain whether (in each case) the degree of inactivation would have been smaller if the glucose had been added earlier. This was tested in the following experiment; Table II, I; the same concentration of fluoride was added to different samples at different intervals before the glucose.

TABLE II.  
Glucose concentration 23.2 mmol/l,  $t = 25^\circ$ .

No.				1	2	3	4	5
I	Fluoride $\rightarrow$ glucose interval	Fluoride conc. mmol/l		0	25	37.5	50	75
	10 minutes . . . . .	Initial rate $\mu\text{l O}_2/\text{min}$	n	6.4 —	4.3 0.67	0.3 0.05	$\infty$ $\infty$	$\infty$ $\infty$
	5 " . . . . .	" "	"	6.4 —	5.2 0.80	0.9 0.13	$\infty$ $\infty$	$\infty$ $\infty$
	2 " . . . . .	" "	"	6.4 —	5.9 0.92	2.1 0.33	0.3 0.05	$\infty$ $\infty$
	2—3 seconds . . . . .	" "	"	6.4 —	6.5 1.01	3.3 0.56	0.3 0.05	$\infty$ $\infty$
II	Glucose $\rightarrow$ fluoride interval							
	2 minutes . . . . .	Final rate $\mu\text{l}/\text{min}$ .	"	5.2 —	5.2 1.00	3.2 0.62	0.5 0.10	$\infty$ $\infty$
	The rate becomes less than that of the control after minutes . . . . .				—	100	60	20

Table II, II gives some data from a parallel experiment with the fluoride added at different intervals after the glucose. For practical reasons the data had to be combined from two different experiments carried out with yeast of almost equal sensitivity.

The value 6.4 of the control in Part I of Table II is the average of five estimations (standard error  $\pm 0.06$ ).

When the fluoride is added before the glucose — even as short a time as 2—3 seconds — the curves separate from the beginning from the control curve as the curves 2 and 3 of Fig. 1.

When on the other hand the fluoride is added two minutes later than the glucose, the initial rate is practically equal to that of the control ( $n = 1.00$ ) in all the samples as in the curves 4 and 5, Fig. 1. But as in the experiment Fig. 1, the curves separate after a longer or shorter space of time with the exception of the sample 2 (the lowest concentration, 25 mmol/l fluoride). Here the curve coincides with the control curve during the whole experiment (210 minutes). The later the curves separate from the control, the greater the final rate. With the interval glucose  $\rightarrow$  fluoride increasing from 2 to 5 or 10 minutes the curves remain identical within experimental error. That is why data have been included in Part II of the table only for the interval 2 minutes.

Table II shows that, the shorter the fluoride  $\rightarrow$  glucose interval, the greater the rate of respiration when the glucose has been added. It is evident that, if we add the glucose at any interval after the fluoride, the rate of respiration which we find is an indication of the stage

which has just been reached in a slow inactivation of the enzyme by the fluoride; by the addition of glucose we check or arrest the inactivation of the enzyme at whatever value has been reached. This is in agreement with earlier work; see 2), page 346, Fig. 5a and Table III. In low concentrations of fluoride at any rate the reaction between fluoride and the enzyme before the addition of glucose is a slow process; after the addition of glucose this rate of inactivation is still lower, or is too small to detect. This suggests that the slowness of the inactivation before the addition of glucose and the slowness of the inactivation after the addition of glucose do not arise from two different causes, but are merely the same phenomenon in different degree. That is to say, the yeast used in these experiments has been fed on sugar at the factory and the slowness of the action of fluoride is to be ascribed to some remaining effect of this, when no glucose has been added since. This suggestion is strongly supported by many experiments to be described below. The additional protective action of added glucose is superimposed on a certain primary protection due to some substance or substances present in the cell. The mechanism of the protection will not be considered here.

Fig. 2 gives the aerobic fermentation in the experiment of Table I; the A values are given in Table I, II.

The course of the aerobic fermentation in the control is subject to considerable variation in different experiments. The fermentation is measurable during the first 30–40 minutes of the experiment but falls off to zero. After a time a „secondary fermentation” gradually develops. The time of

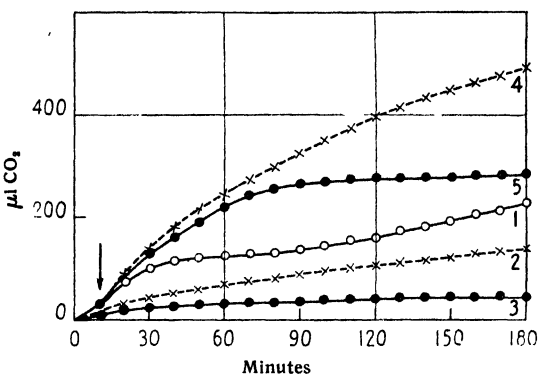


Fig. 2.

onset of this secondary fermentation is variable and depends also on the glucose concentration. In lower concentrations of glucose it is not observed at all. Curves 2 and 3 of fig. 2 show that the fermentation is strongly inhibited when the fluoride has been added before the addition of glucose (cf. also Table I, II No. 2 and 3). If, on the contrary, the glucose has been added before the fluoride, a remarkable stimulation of the fermentation occurs ( $n$  thus  $>1$ , cf. table I, II No. 4 and 5). In the lower fluoride concentration, 37,5 mmol/l, the fermentation continues at decreasing rate during the course of the experiment (curve 4). In the higher fluoride concentration the stimulated fermentation decreases more quickly, and about 90 minutes after the addition of fluoride a complete inhibition has been reached (curve 5).

The stimulation of the fermentation occurs at low fluoride concentrations also if the fluoride is added before the addition of glucose. This phenomenon has been described previously and the following explanation of it has been offered (4). The fluoride inhibits the storage of glucose in the form of higher carbohydrates and thus increases the amount of substrate available for the respiration and the fermentation. If the chains of enzymes acting in one or the other of these processes are not saturated with substrate an increase of rate will follow an increase of the concentration of available substrate. The respiratory system is saturated at a lower concentration of substrate than the fermentation system. This may be the reason why a stimulation of fermentation is more often observed than a stimulation of respiration.

In a number of experiments the glycogen formation or breakdown was studied by means of staining with iodine (LUGOL solution in arabic gum \*). It was confirmed that the formation of glycogen is inhibited by fluoride (cf. WERTHEIMER 10)). In further experiments it was found that the breakdown of glycogen in the living cell was also inhibited by fluoride. According to CORI 11) the reaction:  $\text{glycogen} + \text{phosphate} \rightleftharpoons \text{glucose-1-phosphate}$  is not sensitive to fluoride.

\*) The studies on glycogen have been carried out in this laboratory by Mr. K. BRANDT, who will describe the results in an article in press („Protoplasma”, 1941).

In synthesis as well as in breakdown this reaction must be coupled in the living cell to fluoride sensitive reactions. From some experiments, it seemed evident that the glycogen formation was somewhat inhibited in the presence of low concentrations of fluoride in spite of the fact that the respiration was stimulated. This gives some additional support to our contention concerning the mechanism of the stimulation of the respiration and fermentation.

2) The protection against fluoride in different concentrations of glucose. In all experiments described in Section (a) the concentration of glucose was 23.2 mmol/l; it was found that the addition of this concentration of glucose almost completely checked any inactivation by fluoride that was proceeding; and when the glucose was added before the fluoride it delayed the onset of inhibition. It is of interest to know whether lower concentrations of glucose will have the same effect. For this purpose three lower concentrations, 2.9, 5.8, and 11.6 were used as well as 23.2 mmol/l. We shall first describe an experiment in which the fluoride was added 5 minutes after the glucose. Some of the data obtained are given in Table III.

TABLE III \*).

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Conc. of glucose mmol/l	2.9			5.8			11.6			23.2		
Conc. of fluoride mmol/l	0	37.5	75	0	37.5	75	0	37.5	75	0	37.5	75
A, $\mu\text{l O}_2 \times$ minutes	36,800	47,900	17,500	61,000	69,500	22,400	75,500	75,000	22,200	76,200	72,300	27,200
n	—	1.30	0.50	—	1.14	0.37	—	$\sim 1.00$	0.30	—	0.95	0.36

\*)  $t = 25^\circ \text{C}$ .

It is striking that in the two lower concentrations of glucose the addition of 37.5 mmol/l fluoride does not cause an inhibition but on the contrary an increase of the respiration. As shown by Figure 8 (2.9 mmol/l glucose) the curves 1 (control) and 2 (37.5 mmol/l fluoride) coincide in the beginning and separate after about 80 minutes. (In the samples with 5.8 mmol/l glucose,

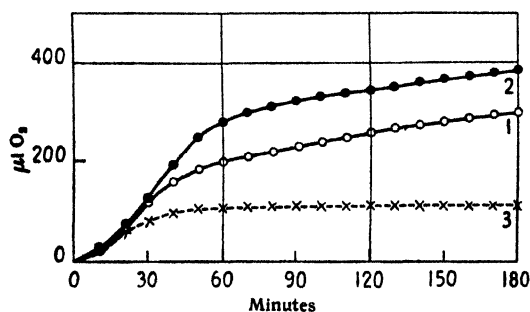


Fig. 8.

not shown in the figure, the results are similar but the curves separate after 60 minutes). It is evident that the decrease of rate begins a little earlier in the control than in the sample with the lower concentration of fluoride (curve 2). This is in keeping with our earlier conclusions (p. 1) as to the cause of the stimulation conferred by low concentrations of fluoride. The initial rate of respiration of the control is as high as in the higher concentrations of glucose but the concentration falls off rapidly due to the synthesis of higher carbohydrates from the

glucose. If this synthesis is inhibited by fluoride more substrate is made available, and this will postpone the moment at which deficiency of substrate first begins to limit the rate of respiration.

The data of Table III show above all that the additional protection conferred by added glucose is not decreased over the range investigated with decreasing concentration of glucose. Even lower concentrations of glucose were used in experiments

of the type of Table III e.g. 1.9 mmol/l. At this concentration a strong protection was conferred by the glucose added 10, 5 or 2 minutes before the fluoride. The lower the concentration of glucose, the greater are the difficulties of making good measurements as the stationary period of respiration becomes briefer and briefer.

The higher degree of protection which seems to prevail in the concentrations 2.9 mmol/l glucose according to table III is certainly only apparent. The addition of glucose protects in two ways against fluoride. The action of fluoride is delayed and the level of the constant rate finally attained is higher than in cases in which the fluoride acted before the addition of glucose. The low concentrations of glucose are consumed so rapidly that the fluoride added after the glucose does not have sufficient time to display its full inhibitory action, which is delayed by the presence of glucose.

The following method has been applied in some experiments. A certain low concentration of glucose was added to the suspension of yeast cells in the main compartment of the manometric flask. This was joined to the manometer and immersed in the water-bath. Ten minutes after the addition of the glucose fluoride was added from one side-arm and after 10 further minutes a higher concentration of glucose (23.2 mmol/l) was added from an other side-arm. The results of an experiment of this sort are found in Table IV.

TABLE IV.

10 minutes before the fluoride different low concentrations of glucose (cf. below II–V), 10 minutes after the fluoride 23.2 mmol/l glucose were added,  $t = 25^\circ$ .

No.				1	2	3	4
Fluoride concentrations m mol/l				0	25	37.5	50
	Glucose added before the fluoride m mol/l						
I	0	A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{min}$		83,500	71,900	5,990	$\infty 2,000$
			n	—	0.86	0.07	$\infty 0$
II	0.14	„		81,500	81,000	16,900	$\infty 2,000$
		„		—	1.00	0.21	$\infty 0$
III	0.28	„		81,500	81,500	14,300	$\infty 2,000$
		„			1.00	0.18	$\infty 0$
IV	0.56	„		85,500	84,400	34,600	$\infty 2,000$
		„		—	1.00	0.40	$\infty 0$
V	1.10	„		86,400	85,500	65,800	6,700
		„		—	1.00	0.76	0.08

Even the low glucose concentration 0.14 mmol/l added before the fluoride confers a certain protection which increases with increasing concentration of glucose added before the fluoride. The variation of protection with the concentration of glucose added first is evident above all in column 3 of Table IV, 87.5 mmol/l fluoride. The curves giving the n-values of respiration or fermentation as a function of the fluoride concentration are rather steep. The range of concentrations which give n-values between  $\infty 0$  and  $\infty 1.00$  is consequently narrow. The fluoride concentration 25 mmol/l inhibits in this experiment only in the absence of glucose added before



the fluoride, while the  $n$ -value is  $\approx 0$  (i.e.  $n < 0.08$ ) in the presence of 50 mmol/l fluoride until the highest concentration of glucose added before the fluoride has been reached. Then the rather low  $n$ -value 0.08 is found. In presence of 87.5 mmol/l fluoride a range of  $n$ -values are observed which increase in a way almost directly proportional to the concentration of glucose added before the fluoride.

By this experiment it was thus possible to demonstrate that the protection depends on the glucose concentration. The protection, however, reaches its maximum at a comparatively low concentration of glucose. It must be remembered that the glucose added before the fluoride is attacked immediately by the yeast cells. The concentration of glucose is therefore already considerably lowered when the fluoride is added. It is therefore possible that the action of glucose in the lower concentrations is mainly an indirect one involving a sort of pre-treatment with glucose, (cf. below p. 18).

In I, Table IV, the curves representing the  $O_2$ -consumption diverge from the beginning, as curves 1, 2, 3 of Fig. 1. In II—V the course of the curves is more similar to that of curves 1, 4, 5 of Fig. 1. The control and the fluoride curves at first coincide and only after some time do the curves separate, those corresponding to the samples with fluoride added breaking off more strongly than the control curves.

Experiments were also carried out in the following way. The fluoride was measured into one side-arm (I) together with 0.1 ml of a glucose solution of varying concentration. The fluoride and a certain amount of glucose was thus added simultaneously to the yeast suspension of the main compartment of the manometric flask. Ten minutes later glucose of higher concentration was added from a side-arm (II). This last addition corresponded as usual to a concentration of 28.2 mmol/l in the final volume (2.4 ml) of the sample.

Also in this case the previous addition or glucose increased the protection against fluoride. It is remarkable however that the control and the fluoride curves now diverge from the beginning as the curves 1, 2, 3 of Fig. 1. Like these they are almost linear with a not very pronounced kink. The first portion of glucose is added too late in this case to prevent an immediate action of the fluoride. A certain number of enzyme molecules are inactivated by the fluoride but on account of the presence of the first portion of glucose this inactivation does not proceed as far as in the absence of the glucose.

In Table V the rates of respiration are given, which prevail after the addition of the second portion of glucose from side-arm II. Ten minutes earlier a first portion of glucose + fluoride had been added from side-arm I. The rate of respiration in the control without fluoride was  $6 \mu l O_2$  per minute.

TABLE V \*).

No.	1	2	3	4	5	6
Glucose concentration m mol/l in the samples after the addition of the first portion of glucose together with fluoride (37.5 m mol/l) . . . . .	0	0.32	0.63	1.25	2.5	5.0
Rate of respiration $\mu l O_2$ /min. after the addition of the second portion of glucose . . . . .	0.2	1.5	1.5	1.5	1.8	2.2
$n$	0.03	0.25	0.25	0.25	0.3	0.32

\*)  $t = 25^\circ C$ .

**3) Protection in starved and „restored” yeast.** The great sensitivity of starved yeast towards fluoride added before glucose has been demonstrated in our previous paper (2). It was shown however that the inhibition was less strong when the glucose and the fluoride were added simultaneously to a suspension of starved yeast. In a number of new experiments a wider range of concentrations of fluoride has been used than in the previous experiments with starved yeast. Table VI and Fig. 4 and 5 give details of one experiment.

TABLE VI.  
Glucose conc. 23,2 mmol/l,  $t = 25^\circ$ .

No.	1	2	3	4	5	6	7
Fluoride conc. mmol/l . . . . .	0	8.3	12.5	16.6	25	37.5	50
I Fluoride $\rightarrow$ glucose interval: 10 minutes							
Initial rate $\mu\text{l/min}$ . . . . .	4.9	5.0	—	—	0.1	—	—
n	—	$\approx 1.00$	—	—	0.02	—	—
Rate 30—50 minutes . . .	—	—	2.74	0.85	—	—	—
Rate 100—210 minutes . .	—	—	0.56	0.17	—	—	—
	—	—	4.25	2.5	—	—	—
	—	—	0.87	0.51	—	—	—
II Glucose $\rightarrow$ fluoride interval: 10 minutes							
Initial rate . . . . .	4.8	—	—	—	—	4.8	4.8
"	—	—	—	—	—	1.00	1.00
Final rate . . . . .	3.6	—	—	—	—	4.2	1.3
"	—	—	—	—	—	$>1.00$	0.36

It is evident that a recovery of the respiration occurs at low fluoride concentrations when the fluoride has been added before the glucose, Table VI, I No. 3 and 4, curves 3 and 4, Fig. 4. In the beginning of the experiment the rate is extremely low but increases gradually until a rate is attained,

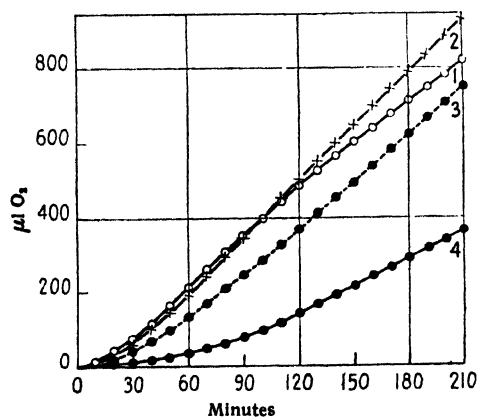


Fig. 4.

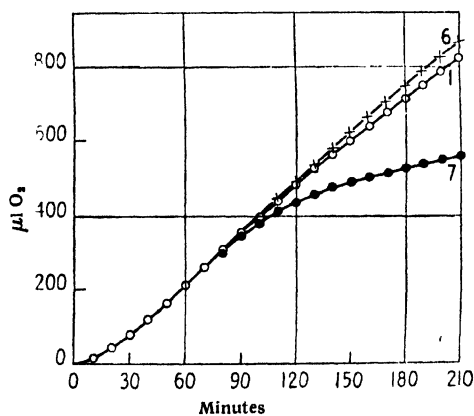


Fig. 5.

which remains constant until the end of the experiment (duration of this 210 minutes). When the concentration of fluoride added is 25 mmol/l the inhibition is complete, Table VI, I No. 5.

In contrast to this a still higher concentration of fluoride 37.5 mmol/l does not give any inhibition at all when added 10 minutes after the glucose, II, No. 6 and Fig. 5. On the contrary

a slight stimulation occurs in this concentration of fluoride. In the experiments fluoride  $\rightarrow$  glucose the same behaviour is observed in a 4.5 times lower concentration of fluoride (8.3 mmol/l). The final rate in No. 7 (50 mmol/l) is considerably higher than the rate in No. 5, in which sample 25 mmol/l fluoride has been added 10 minutes before the glucose.

The additional protection observed when the glucose is added before the fluoride has nothing to do with a decreased permeability. MALM<sup>3</sup>) found that the addition of glucose does not decrease the permeability which has been increased by starvation. MALM infers from this that the increase of permeability is not only due to a starvation with respect to carbohydrates. Other necessary compounds also have been removed to some extent. This again is in agreement with our studies on the uptake of pyruvic acid (12) which is very much decreased in starved yeast. A recovery in this respect only happens when the starved yeast has been pretreated with glucose + yeast extract.

The observations of a recovery reported in this section prove that the sensitivity of the enzyme is a more important factor than permeability in determining the degree of inhibition conferred by fluoride. An outward diffusion of fluoride following a previous penetration has not been observed by MALM under the conditions prevailing in this experiment. On the other hand the recovery finds a simple explanation on the basis of the assumption that a protection of the enzyme gradually develops on addition of glucose. The protecting derivative of glucose is able to displace the fluoride from the enzyme, when the inhibiting concentration of fluoride is low, cf. p. 23.

In the experiment reported in Table VII the yeast was starved by incubation in a flask containing 250 mg. yeasts in 20 ml. water. The flask was shaken with a frequency of about 120 oscillations per minute and with an amplitude of 20–25 cm. The bottom area of the flask was such that the height of the layer of suspension was only some few mm., the aeration thus being very efficient.

For comparison with this 0.5 ml of 185 mmol/l glucose was added to the suspension of starved yeast in a parallel flask three times (16, 17, 18 hours after the onset of the suspension). The shaking was continued 30 minutes after the last addition when the yeast was centrifuged off and washed twice with distilled water. The yeast was resuspended in the ordinary s.s.-buffer solution and the samples were prepared in the standard way for the manometric measurements of respiration and fermentation. The results show that this treatment with glucose is sufficient to restore the yeast, so that it behaves towards fluoride as a non-starved yeast with a considerable degree of primary protection. For 25 mmol/l fluoride, added 5–10 minutes before the glucose, gave no or practically no inhibition of respiration; this must be contrasted with the  $n$ -value of 0.02 reported for starved yeast in Table VI No. 5. As usual the inhibition was very sensitive to the fluoride concentration; thus 37.5 mmol/l fluoride was sufficient to give  $n \approx 0.1$  even in the restored yeast.

The respiration is somewhat higher in the restored yeast with no fluoride (Table VII, IIa No. 1) as compared with the corresponding sample with starved yeast. A comparison of the rate of fermentation in the samples without fluoride gives the opposite result: the fermentation is always higher in starved yeast than in restored or normal yeast (I b and IIb, No. 1). The protection against fluoride is stronger in the restored yeast as compared with the starved yeast. In the restored yeast no inhibition of the respiration prevails even in the concentration 50 mmol/l while in the starved yeast the same concentration yields an inhibition of 0.85 ( $n = 0.65$ ). In the highest fluoride concentration, 75 mmol/l, the difference is less pronounced. A repetition and variation of this experiment gave confirmatory evidence for a certain tendency to stronger protection as an after-effect of a previous treatment with glucose even when the fluoride was added after the glucose.

The  $A$ -values referring to the aerobic fermentation do not lend themselves so well to a direct comparison. On the whole the strong stimulation of fermentation in restored yeast and the slight inhibition even following the addition of 75 mmol/l fluoride Table VII, II b, No. 5, give an impression of stronger protection as compared with the starved yeast. In this the stimulation is less pronounced and the inhibition in the presence of 75 mmol/l is somewhat stronger.

TABLE VII.

Glucose concentration: 23,2 mmol/l,  $t = 25^\circ$ . Glucose  $\rightarrow$  fluoride interval 5 minutes.

No.	1	2	3	4	5
Fluoride conc. mmol/l . . . . .	0	25	37.5	50	75
I. Starved yeast					
a. A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{min.}$ . . . .	64,000	66,600	64,200	41,500	27,000
n	—	1.00	1.00	0.65	0.42
b. A, $\mu\text{l fermentation CO}_2 \times \text{min.}$ . . . . .	30,400	41,000	40,200	34,200	20,200
„	—	1.34	1.32	1.12	0.66
II. Restored yeast					
a. A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{min.}$ . . . .	67,000	69,000	65,500	67,000	37,500
„	—	1.00	1.00	1.00	0.56
b. A, $\mu\text{l fermentation CO}_2 \times \text{min.}$ . . . . .	21,100	50,900	54,600	42,500	17,900
„	—	2.40	2.60	2.00	0.85

Experiments were also carried out in which a pre-treatment of the starved yeast with lactate or acetate was applied. The yeast treated with these substrates showed a behaviour similar to that of starved yeast. This is due to the fact that lactate as well as the acetate is only very slowly oxidized by starved yeast, as will be reported elsewhere. A pre-treatment with alcohol, on the other hand, was efficient in conferring a protection against fluoride to starved yeast. The alcohol is strongly oxidized even by the starved yeast.

4) Protection in yeast pre-treated with glucose. A quantity of 250 mg normal yeast was suspended in 15 ml. 70 mmol/l s.s.-buffer solution, pH 5. To this suspension 2 ml. 360 mmol/l glucose was added, 110 minutes later 1 ml. 360 mmol/l glucose was added again. Ten

TABLE VIII.

Glucose concentration 23.2 mmol/l glucose  $\rightarrow$  fluoride interval 10 minutes,  $t = 30^\circ$ .

No.	1	2	3	4	5	6
Fluoride conc. mmol/l . . . . .	0	25	37.5	50	75	125
I. Sample pre-treated with glucose						
A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{min.}$ . . . .	89,000	90,200	88,100	84,200	61,100	13,300
n	—	>1.00	1.00	0.95	0.69	0.15
II. Sample pre-treated in pure buffer solution.						
A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{min.}$ . . . .	87,500	90,260	82,300	69,940	28,100	9,600
n	—	>1.00	0.93	0.80	0.32	0.11

minutes later the yeast was separated from the buffer-glucose solution, and washed twice on the centrifuge with distilled water. Parallel to this an equivalent amount of yeast was shaken in buffer solution to which 2 and 1 ml. distilled water was added instead of the glucose solution. Here the yeast was centrifuged off at the same time as from the suspension to which the glucose solution had been added. Both kinds of yeast were finally suspended in s.s.-buffer and samples prepared for the manometric measurement according to the standard procedure.

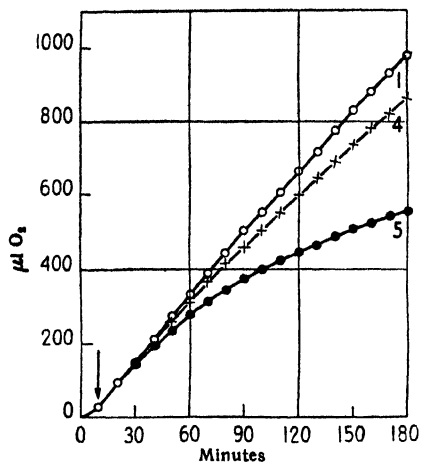


Fig. 6.

Table VIII gives the A-value for the respiration; the fermentation was not determined here. Fig. 6 gives the curve of respiration of the samples I, No. 1, 4 and 5 and Fig. 7 that of the samples II, No. 1, 4 and 5.

It was to be expected that the special feeding with glucose

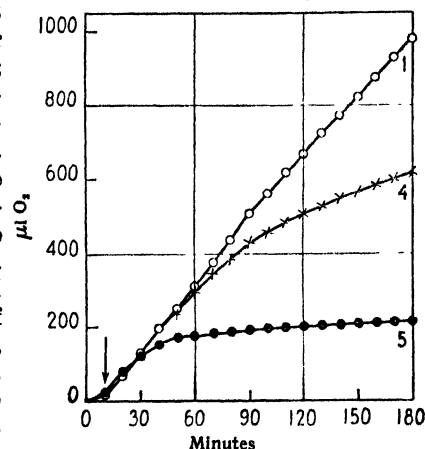


Fig. 7.

might alter the degree of primary protection of the cells. Since the substrate was added ten minutes before the fluoride, the protection observed in this experiment is the combined effect of the primary protection and of the additional protection conferred by the extraneous substrate.

The cells pre-treated with glucose as described above present also a strong protection, when the fluoride has been added before the glucose. This is shown by Table IX, which also gives the A-values for cells pre-treated with pure buffer solution. In the samples containing these the glucose is added before the fluoride.

TABLE IX.  
Glucose conc. 23.2 mmol/l,  $t = 25^\circ$ .

No.	1	2	3	4	5	6
Fluoride conc. mmol/l . . . . .	0	25	37.5	50	75	125
I. Yeast pre-treated with glucose. Fluoride $\rightarrow$ glucose in- terval 15 minutes.						
A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{minutes}$ .	62,000	61,100	63,600	61,800	13,700	1,100
n	—	$\sim 1.00$	$\sim 1.00$	$\sim 1.00$	0.22	0.02
II. Yeast pre-treated with pure buffer solution. Glucose $\rightarrow$ fluoride in- terval 5 minutes . . .						
A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{minutes}$ .	72,300	73,400	70,000	51,000	25,900	8,430
n	—	$\sim 1.00$	0.98	0.7	0.36	0.11

Fig. 8 and Fig. 9 give the course of the curves. It is evident that the cells in the samples I No. 2, 3 and 4 (Fig. 8) are more protected than in the corresponding samples II No. 2, 3 and 4 (Fig. 9); I, No. 4, behaves as in experiments with glucose added before the fluoride, cf. Fig. 8, curve 4. The curve first follows the control but then breaks off. The rate falls from  $\sim 4.3$  to  $\sim 2 \mu\text{l}/\text{minute}$ . This is not expressed in the A-value (Table IX I, No. 4) which is calculated on the basis of the first 180 minutes of the experiment. In the higher fluoride concentrations No. 5 and 6 the protection seems to be stronger in II than in I, Table IX, cf also Fig. 8 and 9, curves 5 and 6. This tends to show that the protection caused by the pre-treatment with glucose is of a character somewhat different from the protection established in the moment of addition of glucose to a suspension of the cells, pre-treated with pure buffer solution.

This lends support to our distinction between „primary” and „additional” protection. Curve 5, Fig. 9, shows a considerable delay of the inhibition. During 90 minutes no inhibition at all occurs but then a strong inhibition develops rather quickly. In curve 5, Fig. 8, the inhibition is pronounced from the beginning of the measurements of the respiration. The inhibition however increases more slowly than the corresponding curve of Fig. 9. The final rate of the  $\text{O}_2$ -consumption is indeed somewhat higher in the sample pertaining to curve 5 of Fig. 8 ( $0.2 \mu\text{l}/\text{minute}$ ) than in the corresponding sample, curve 5 of Fig. 9 ( $0.1 \mu\text{l}/\text{minute}$ ). The addition of glucose removes the inhibitory action of fluoride for a certain time but the protection is not a persistent one. It may be seen that the A-values in this case do not give a complete picture of the differences between the curves under discussion.

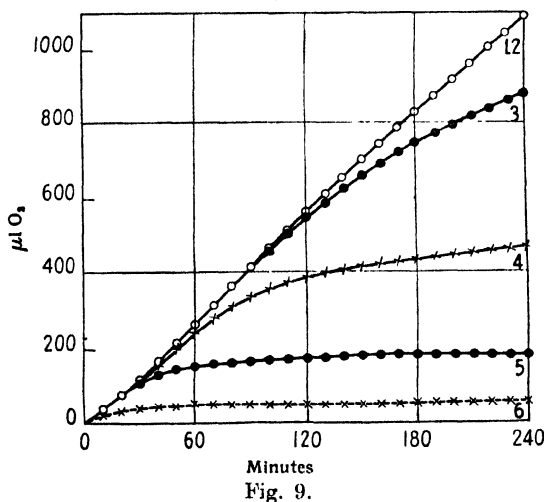


Fig. 9.

differs however in certain respects from the compound formed as a consequence of the pre-treatment. The „additional protection” gradually changes into a „primary protection” by a sort of ripening involving perhaps a gradual change of the protecting derivative of glucose.

The primary and the additional protection indeed reinforce each other, as the data of Table VIII show. An increased protection was found to follow a pre-treatment with glucose. This contrasts with the data of section 2) which demonstrate that the protection is independent over a wide range of the glucose concentration. It follows then also on the basis of the data reported in Table VIII that a certain qualitative difference exists between a primary and an additional protection.

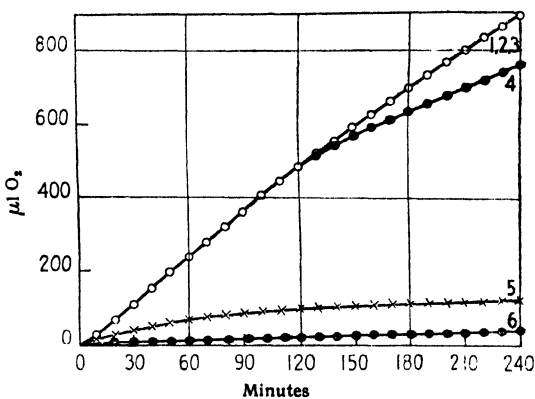


Fig. 8.

The suspensions of cells pre-treated with pure buffer solution show a very low degree of primary protection. When fluoride is added to these cells 15 minutes before the glucose the inhibition is strong even in 25 mmol/l fluoride. In the higher concentrations of fluoride the inhibition is practically complete. The inhibition is very strong as compared with the yeast pre-treated with glucose.

5) Protection conferred by other substrates than glucose.\*). Parallel experiments to those reported in the preceding sections were carried out with pyruvic acid. No details of the results will be given as they essentially agree with those obtained in the experiments with glucose serving as a substrate. Addition of pyruvic acid before the fluoride confers a protection of the oxidation of the pyruvic acid against the inhibitory action of the fluoride.

It has been mentioned already in a previous publication (4) that alcohol is able to confer a protection against fluoride. The evaporation of the alcohol from the side-arm into the main compartment itself protects against fluoride (4). Most of the experiments with alcohol have therefore been carried out in the following way. The alcohol was added directly to the yeast suspension in the main compartment of the manometric flask. This was then joined to the manometer. When the flask has been shaken for about ten minutes in the water-bath the fluoride is added from one side-arm and 10 minutes later 23.2 mmol/l glucose is added from the other side-arm. In a mixture of glucose and alcohol the latter is not oxidized unless its concentration in the mixture is at least ten times that of the glucose (8). The rate of oxidation of glucose is used in this type of experiment as an indicator of the protection conferred by alcohol. The following experiment has been carried out with starved yeast, cf. Table X.

The comparatively strong fluoride concentrations used give a complete inhibition of the oxidation of glucose in the starved yeast, I a. Addition of glucose prevents the reaction of the fluoride with the enzyme, I b. The initial rate is therefore equal in the samples without and

TABLE X.

Starved yeast, 20 mg per sample. Glucose concentration 23.2 mmol/l  $t = 25^\circ$ .

No.	1	2	3
Fluoride concentration . . . . .	0	37.5	50
I. No alcohol added.			
a. Fluoride $\rightarrow$ glucose interval 10 min. Initial rate $\mu\text{l/min.}$ . . . . .	4.7	$\sim 0$	$\sim 0$
n	—	$\sim 0$	$\sim 0$
b. Glucose $\rightarrow$ fluoride interval 10 min. Initial rate $\mu\text{l/min.}$ . . . . . Final rate „ . . . . .	4.7 3.6	4.7 3.1	4.7 1.25
„	—	0.86	0.35
II. 16.8 mmol/l alcohol added 10–15 min. before the fluoride. Fluoride $\rightarrow$ glucose interval 10 min.			
Initial rate $\mu\text{l/min.}$ . . . . .	5	5	5
Final rate „ . . . . .	3.85	2.7	1.6
„	—	0.7	0.42

\*). Some remarks pertaining to the subject of this section have been made above, p. 13.

with fluoride. After 60—70 minutes however the curves separate in the known way, cf. fig. 5. The final rates decrease with increasing fluoride concentration. The experiments with the additions made in the order alcohol → fluoride → glucose show an almost identical course as compared with those of the type glucose → fluoride. In experiment I b the curves separate after about the same time as in experiment II. The previous addition of alcohol protects against the inhibitory action of fluoride so that the action is strongly delayed. Fluoride acts therefore as if it had been added not before but after the glucose.

A slight increase of rate of the control sample (No. 1) is always observed when alcohol has been added first, cf. I b and II, in spite of the fact that the alcohol as a substrate is displaced by the glucose.

As in the experiments with glucose, cf. p. 9, the alcohol concentration has been varied. The A-values from two combined experiments have been tabulated, cf. table XI.

TABLE XI.

10 minutes before the fluoride different concentrations of alcohol (cf. II—VI),  
10 minutes after the fluoride 23.2 mmol glucose were added.  $t = 25^{\circ}$ .

No.				1	2	3	4	5
Fluoride concentration mmol/l . . . . .				0	25	37,5	50	45
I	0	A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{mi-}$ minutes						
				87,000	84,000	16,500	$\sim 2,000$	$\sim 2,000$
			n	—	0.97	0.19	$\sim 0$	$\sim 0$
II	0.17	„		95,000	92,000	12,300	$\sim 2,000$	$\sim 2,000$
			„	—	0.93	0.13	$\sim 0$	$\sim 0$
III	0.84	„		93,500	93,000	52,000	41,000	2,800
			„	—	$\sim 1.00$	0.56	0.44	0.03
IV	1.68	„		99,000	99,000	69,000	46,000	5,000
			„	—	1.00	0.70	0.47	0.05
V	8.40	„		98,000	99,000	78,000	44,000	3,000
			„	—	1.01	0.79	0.45	0.03
VI	16.8	„		100,000	100,000	78,000	38,000	5,000
			„	—	1.00	0.78	0.38	0.05

It is evident that from the concentration 1.68 mmol/l upwards the protection is at its maximum. No protection is conferred by an alcohol concentration as low as 0.17 mmol/l. The alcohol is not metabolized by the cell as quickly as the glucose. The concentrations of alcohol given in the table are therefore nearer to the real concentrations present at the moment of addition of the fluoride than in the corresponding experiment with glucose, cf. Table IV, p. 9.

It was of interest to test the influence of alcohol on the aerobic fermentation. To increase this cystein was added to the yeast suspension in the main compartment of the manometric flask. As known from the work of QUASTEL and WHEATLEY<sup>13)</sup> the aerobic fermentation in bakers yeast is strongly enhanced on addition of cystein. Table XII clearly demonstrates that the addition of alcohol also protects the aerobic fermentation against fluoride.



TABLE XII.

12 mg yeast, fresh weight, per sample. Glucose concentration 23.2 mmol/l 0.85 mmol/l cystein added  $\sim$  15 minutes before the fluoride. Fluoride  $\rightarrow$  glucose interval 10 minutes.  $t = 25^\circ$ .

No.				1	2	3
Fluoride concentration mmol/l				0	37.5	50
I	Without alcohol.	Rate of fermentation $\mu\text{l CO}_2/\text{min.}$ . . .		6	$\sim 0.1$	$\sim 0.1$
			n	—	$\sim 0$	$\sim 0$
II	16.8 mmol/l alcohol added together with the cystein . . .	„		5.9	3.2	1.5
			n	—	0.54	0.25

In some experiments trehalose was added to a suspension of starved yeast to give a trehalose concentration of 8.1 mmol/l. The respiration of the starved yeast (which had been shaken 16 hours in distilled water) was not measurable. On addition of trehalose a feeble respiration was restored. The  $\text{O}_2$ -consumption was about  $50 \mu\text{l}$  in 3 hours. The endogenous respiration in a non-starved sample of the same yeast was  $60 \mu\text{l}$  in 3 hours. The respiration in presence of trehalose has a more constant rate than the endogenous respiration which decreases in the way described by STIER and STANNARD<sup>14</sup>). If trehalose was added to the normal yeast the respiration was equal to the sum of the endogenous respiration and the respiration of trehalose in starved yeast ( $109 \mu\text{l}$  in 3 hours). The starved yeast was as usual very sensitive to fluoride added before the glucose which served as the final substrate as in the experiments with alcohol reported above. If however trehalose had been added before the fluoride a protection against the fluoride inhibition was observed. The fluoride concentration was in this experiment 18 mmol/l. The trehalose was added from the beginning to the yeast suspension in the main compartment of the vessel. The fluoride was added from a side-arm 10 minutes before the addition of glucose, 11.6 mmol/l  $t = 25^\circ$ . The initial stationary rate was determined from the slope of the curves. The results were as follows.

TABLE XIII.

			Conc. of fluoride mmol/l		
			0	18	
I	Without addition of trehalose . . . . .	Rate of respiration $\mu\text{l O}_2/\text{min.}$ . . .	n	3.6 —	0.22 0.06
II	Trehalose added . . . . .	„	„	3.6 —	1.85 0.51

The trehalose used was a preparation obtained in a known way by extraction from bakers yeast cf. (<sup>15</sup>). Glucose estimation according to WILLSTÄTTER and SCHUDEL gave a content of 0.6% glucose in the trehalose. This is a maximum value for the glucose present. A comparison with Table IV p. 9 shows that the glucose concentration certainly was too low to contribute to the protection. This must therefore be ascribed to the action of the trehalose.

Fairly extensive experiments showed that **serum from the rabbit** confers a protection, when added before the fluoride. This protecting effect was observed, even when the serum had been dialysed and diluted 1 : 5 with tap water; 0.3 ml serum was added directly to a suspension of starved yeast;  $\infty$  15 minutes later 16.7 mmol/l fluoride and after a further 10 minutes interval 11.6 mmol/glucose were added (final volume as usual 2.4 ml). By comparison of the stationary rates of the control and the sample with serum and fluoride a *n*-value of 0.8 was calculated. For a parallel sample with fluoride but without serum the *n*-value was found to be 0.1. The protection conferred by the serum is thus considerable. Addition of 0.2 ml 10% cryst. egg albumen or 0.2 ml 4.8% gum arabic solution had no protecting effect whatsoever.

Some experiments were conducted in the following way. The dialysed serum was added as above to starved yeast in s.s.-buffer-solution. The mixture was shaken in the manometric flask for 140 minutes. Only after this time the fluoride was added from one side-arm and 10 minutes later the glucose was added from the second side-arm. The inhibition conferred by fluoride was very strong (*n* = 0.05 — 0.1) the protecting effect of the serum was removed. This experiment tends to prove that some substrate is available for the yeast even in the dialysed serum, a substrate, which is consumed by a prolonged action of the yeast. With the disappearance of this the protection is removed. The addition either of dialysed or non-dialysed serum gives a measurable respiration to starved yeast; without this addition practically no respiration was observed. This speaks also in favour of the assumption that even in the dialysed serum some substrate must be available, this substrate perhaps being adsorbed by the serum proteins.

It seems from the preceding report that substrates which are oxidized by the yeast confer a protection against fluoride. It was therefore of interest to test the action of substances which are not attacked by the yeast. Two substances chemically related to glucose; **arabinose** and **galactose**, have been tested. These were added directly to the yeast suspension in the main compartment. Fluoride in the concentrations 37.5 and 62 mmol/l was added 15 minutes before the glucose (11.6 mmol/l). The arabinose and galactose had no influence on the rate of respiration in samples without fluoride, the initial stationary rate after the addition of glucose being 5.7 — 5.9  $\mu$ l/minute. The higher fluoride concentration gave throughout a complete inhibition of the respiration. The addition of the lower fluoride concentration gave *n*-values of 0.03—0.04 in the presence of glucose as well as in presence of arabinose + glucose. When galactose had been added previously the inhibition conferred by fluoride decreased somewhat (*n*  $\infty$  0.15). It could be demonstrated that while arabinose does not influence the respiration, the presence of galactose already confers a marked increase of the respiration taking place before the addition of glucose. It must be left open whether the galactose was contaminated with glucose or whether it is attacked to a slight degree by yeast. The extent to which arabinose and galactose penetrate into the cells is not yet known. The endogenous respiration per 3 hours amounted to 80  $\mu$ lO<sub>2</sub>, while the addition of 0.02 mol/l galactose gave an O<sub>2</sub>-consumption of about 200  $\mu$ l for the same period of time. The increase of the respiration during the period of the pre-treatment with fluoride is sufficient to account for the slight protection against fluoride conferred by the previous addition of galactose.

**6) The protection of fermentation under anaerobic conditions.** It has been reported previously <sup>(1)</sup> that the fermentation of glucose is very sensitive to the inhibitory action of fluoride under anaerobic conditions, if the fluoride is added before the glucose. The range of concentrations of fluoride which cause strong inhibition (*n* < 0.05) is lowered to 6—12 mmol/l, or even more, while the concentration giving strong inhibition of the respiration in normal yeast > 25 mmol/l when the pre-treatment with fluoride is conducted under aerobic conditions.

If however the fluoride is added after the glucose a strong protection is observed even under anaerobic conditions.

In Table XIV an experiment is reported which gives evidence for these general statements. In the anaerobic experiments the yeast content of the samples (volume 2.4 ml) was in general lowered to 12 mg (wet weight). Chromous chloride (0.3 ml) was introduced, for the anaerobic

TABLE XIV.

12 mg normal yeast in each sample. Glucose concentration 23.2 mmol/l gas space: nitrogen.  $t. = 25^\circ$ .

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fluoride concentration mmol/l	0	4	8	12.5	16	25	37.5	50	75
I. Aerobic experiment.									
a. Fluoride $\rightarrow$ glucose interval 10 minutes									
Stationary rate $\mu$ /min. .	3.6	—	—	3.6	3.6	—	—	—	—
n	—	—	—	1.0	1.0	—	—	—	—
b. Glucose $\rightarrow$ fluoride interval 10 minutes . . .									
A, $\mu$ l O <sub>2</sub> $\times$ minutes . . .	51,600	—	—	—	—	51,600	51,100	45,600	27,500
n	—	—	—	—	—	$\approx 1.00$	0.99	0.88	0.53
II. Anaerobic experiment									
a. Fluoride $\rightarrow$ glucose interval 10 min.									
Stationary rate $\mu$ /min. .	8.0	0.3	0.15	0.03	$\approx 0$	—	—	—	—
n	—	0.04	0.02	$< 0.01$	$\approx 0$	—	—	—	—
b. Glucose $\rightarrow$ fluoride interval 10 min. . . A, $\mu$ l CO <sub>2</sub> $\times$ minutes	121,000	—	—	—	—	120,000	119,000	96,400	14,900
n	—	—	—	—	—	1.00	0.98	0.80	0.12

samples, into the central cup of the manometric flasks to remove the last traces of oxygen from the nitrogen which was previously purified over copper at  $500^\circ$ . The directions given by WARBURG, KUBOWITZ and CHRISTIAN<sup>16</sup>) were adhered to in preparing the chromous chloride.

In Table XIV, Ia, No. 4 and 5 it is demonstrated that under aerobic conditions no inhibition occurs in fluoride concentrations which cause complete inhibition anaerobically, cf. II a, No. 2—5. If on the contrary the glucose is added first the n-values are not far below those of the aerobic samples, cf. Table XIV IIb and Ib. Only in the concentration 75 mmol/l the fluoride seems to cause a distinctly stronger inhibition under anaerobic (IIb No. 9) than under aerobic conditions (Ib No. 9) in the experiment glucose  $\rightarrow$  fluoride. Figs. 10 and 11 supplement the table. The curves separate earlier in the anaerobic experiments from the control than under aerobic conditions, cf. Fig. 11, curve 8 and 9 with the curves 8 and 9 of Fig. 10.

Sometimes a considerable stimulation of the fermentation is observed in anaerobic experiments in presence of 25—37.5 mmol/l fluoride. In one experiment glucose  $\rightarrow$  fluoride, with

suspensions of 20 mg yeast per sample (2.4 ml) the n-value amounted to 1.2 in presence of 37.5 mmol/l fluoride. The glucose concentration was 23.2 mmol/l which corresponds to a total amount of fermentation  $\text{CO}_2$  of 2500  $\mu\text{l}$  per sample. In the experiment carried out with suspensions heavier than those used in the experiment reported in Table XIV the fermentation was more rapid and attained its completion after about 150 minutes. The total fermentation in the control amounted to  $\sim 68\%$  of the theoretical value. In presence of 37.5 mmol/l fluoride  $\sim 85\%$  of the glucose was broken down by fermentation. The non-fermented glucose has been stored as higher carbohydrates (a glycogen formation can be demonstrated by staining with iodine, cf. above p. 7). It is evident that in the case reported the fluoride has partly inhibited the storage of glucose. In agreement with the view presented previously (4 and above p. 7) we consider the inhibition of storage as the probable cause of the stimulation of the fermentation in presence of low concentrations of fluoride.

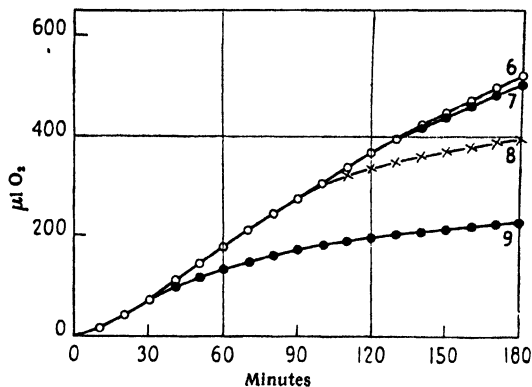


Fig. 10.

The „primary” protection is evidently considerably lowered under anaerobic conditions. This statement is valid for the fluoride sensitive enzyme acting in fermentation as well as for that acting in respiration. For the latter this follows from results reported previously (2), cf. specially p. 349-50). The fluoride was added to a suspension saturated with nitrogen; later this was replaced by air and the glucose was now added under aerobic conditions. The inhibition was much stronger under these conditions than when the experiment was carried out from the beginning under aerobic conditions.

The addition of substrate confers also under anaerobic conditions considerable additional protection, as evident from Table XIV and Fig. 10 and 11. Following the addition of glucose the anaerobic fermentation is almost as resistant to fluoride as the respiration or the aerobic fermentation.

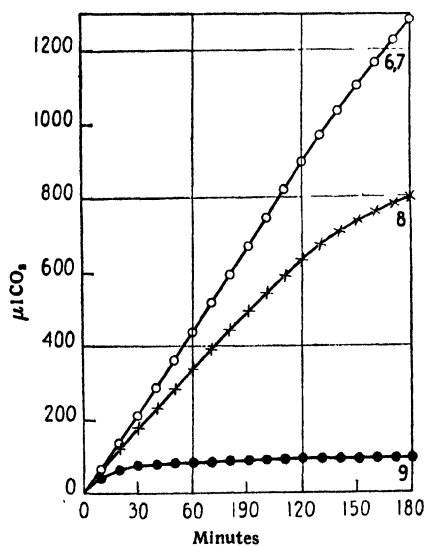


Fig. 11.

**7) Influence of pre-treatment on the inhibition of anaerobic fermentation by fluoride added before the glucose.** It has been claimed previously (2) that starved yeast and normal yeast do not present any difference as to the sensitivity of the anaerobic fermentation towards fluoride. In the experiments in question the fluoride was added before the glucose. It seemed from this that the pronounced difference found under aerobic conditions between normal and starved yeast is abolished under anaerobic conditions. Repeated experiments apparently confirmed the earlier ones. Later, however, experiments were commenced with yeast which had been specially fed with glucose

under aerobic conditions as described above p. 13-14. This yeast was compared with one treated under the same conditions but with equal volumes of distilled water added instead of the glucose solutions. A pronounced after-effect of the pre-treatment with glucose was observed also under anaerobic conditions. It was further found that the results are dependent upon the completeness of the removal of oxygen; the nitrogen contains

traces of oxygen even after passing glowing copper. The low respiration taking place confers a certain degree of protection, when the fluoride is added before the addition of glucose.

The pre-treatment was carried out under aerobic conditions in the following ways: I. 250 mg yeast were suspended in 70 mmol/l s.s.-buffer in flasks which were shaken in a water-bath at 25°. 2 ml 370 mmol/l glucose were added immediately. After 1 hour 1.5 ml and after two hours 1 ml 370 mmol/l glucose were added.

II. Simultaneously a parallel sample was shaken, to which, instead of the glucose solution, the corresponding amount of distilled water was added.

The shaking was interrupted 15 minutes after the last addition of glucose or distilled water. The yeast was washed thoroughly, centrifuged, and re-suspended as usual in s.s.-buffer solution.

The samples were made in duplicate. The air was replaced by nitrogen purified over copper at 500°. Chromous chloride (0.8 ml) was introduced as described above into the central cup of the manometric flask. The samples with yeast fed previously are designated below as I, those with unfed yeast as II. One set of samples was shaken 5 minutes, another set 50 minutes before the addition of fluoride (I<sub>5</sub>, II<sub>5</sub>, I<sub>50</sub>, II<sub>50</sub> respectively). The stationary rates of fermentation are given in Table XV.

TABLE XV.

20 mg yeast per sample, glucose concentration 23.2 mmol/l. Fluoride→glucose interval 10 minutes, gas space: nitrogen, t = 25°.

No.			1	2	3	4
Fluoride conc. m mol/l . . . . .			0	4.2	6.3	8.4
I <sub>5</sub>	Stationary rate, $\mu$ l per minute		11.5	11	11	10.5
		n	—	0.95	0.95	0.90
II <sub>5</sub>	„ „ „		16.7	12.8	9.9	2.2
		„	—	0.76	0.59	0.13
I <sub>50</sub>	„ „ „		10.1	9.9	8.8	1.1
		„	—	1.00	0.87	0.11
II <sub>50</sub>	„ „ „		13.3	2.6—5.3	1.4—2	1.0
		„	—	0.19—0.4	0.11—0.15	0.07

It is evident from the data given that there is a considerable difference between the samples I<sub>5</sub> and II<sub>5</sub>, the fed yeast being more protected against fluoride than the unfed yeast. In the former hardly any inhibition occurs at all. This difference seems to be smaller if strictly anaerobic conditions are not adhered to, e.g. if no chromous chloride is added \*). The non fed yeast behaves then in a way which is more similar to that exhibited by the fed yeast. One further feature of this experiment is remarkable. During the shaking under anaerobic conditions some change must occur in the yeast, a change which renders it more sensitive to fluoride. A strong inhibition is observed in I<sub>50</sub> with 8.4 mmol/l NaF, in II<sub>50</sub> the inhibition has increased still more. The protection conferred by the feeding has decreased. Evidently a protection was at work also in the unfed yeast in II<sub>50</sub>, a protection which has been broken down here during the anaerobic incubation in the shaken manometric flasks. No constant values could be given however for II<sub>50</sub> 2 and 3 (4.2 and 6.3 mmol/l fluoride respectively). In fact the curves are not linear in these cases. During the first 10 minutes the rate is almost equal to zero but increases,

\*) It was proved in special experiments that the presence of chromous chloride in the central cup has no poisonous action.

the final rate in No. 2, 5.8  $\mu$ l per minute, being attained only after 70-80 minutes from the addition of the glucose. The inhibition seems here to be complete in the beginning of the experiment but a certain recovery is taking place. From the table it is also evident that the final rate of fermentation in the unfed yeast is still lower as compared with the rate in the fed one.

The experiments with strict anaerobiosis were repeated and confirmed several times with varied fluoride concentrations ranging from 2.5 to 25 mmol/l fluoride. Also the peculiar shape of the curves representing the fermentation in the samples with fluoride was reproduced in a more or less pronounced way. In Fig. 12 a set of curves is given, which beautifully shows the recovery occurring after the addition of glucose to unfed yeast. The fluoride was added only after a 40 minute period of shaking under strictly anaerobic conditions. The yeast had been subjected to a pre-treatment similar to that described above, p. 22, with addition of distilled water. In the corresponding samples in which the yeast had been fed with glucose the inhibition was much lower in the lower concentrations of fluoride as compared with the results in the unfed yeast. With respect to the changing rate of the respiration in the samples with unfed yeast, A-values were calculated for both the fed (I) and the unfed yeast (II) and are given in Table XVI.

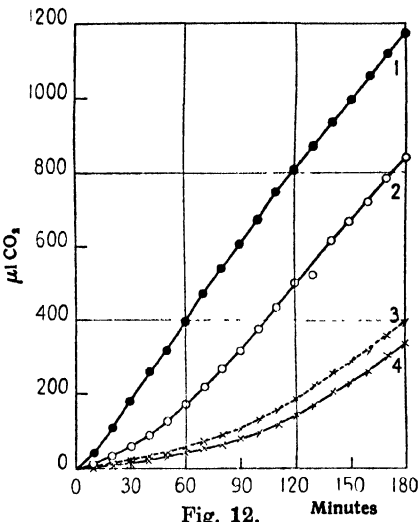


Fig. 12.

TABLE XVI.

12 mg yeast per sample. Glucose conc. 23.2 mmol/l,  $t = 25^\circ$ . Fluoride  $\rightarrow$  glucose interval 10 minutes.

No.		1	2	3	4	5	6
Fluoride conc. mmol/l . . . . .		0	3.7	4.2	6.2	8.4	12.4
I. A, $\mu$ l $\text{CO}_2 \times$ minutes . .	n	95,700 —	— —	— —	97,000 1.00	46,700 0.49	6,400 0.07
II.     "     "     "	"	106,100 —	65,100 0.61	22,400 0.22	20,300 0.19	9,000 0.09	— —

The recovery found in this experiment, cf. Fig. 12, is of quite analogous nature to the recovery found in starved yeast in experiments carried out under aerobic conditions. A number of experiments has shown that the level of protection is still lower in starved yeast under anaerobic than under aerobic conditions. In the aerobic experiment, Table VI, no inhibition was conferred by 8.3 mmol/l fluoride, while in the anaerobic experiment, Table XVI, a considerable inhibition occurs even at 3.7 mmol/l fluoride.

In higher concentrations of fluoride (16, 25, 37.5 mmol/l fluoride) the recovery process becomes less conspicuous and finally vanishes.

Starved yeast and normal D5-yeast were also compared as to their sensitivity towards fluoride under strictly anaerobic conditions (chromous chloride, manometers shaken in nitrogen 30-40 minutes before the addition of fluoride). A similar difference was found here as in the experiments with unfed and fed yeast referred to above. The normal yeast is more resistant towards the action of the fluoride as compared with the starved yeast. This difference evidently is less pronounced if the anaerobiosis is not strictly adhered to. This would explain why we failed to detect the difference in earlier experiments. It seems also pro-

bable that the prolonged period of shaking of the yeast in the water-bath before the experiments tends to accentuate the difference here as in the experiments with fed and unfed yeast. Finally in our earlier experiments we did not vary the concentrations of fluoride as much as in the present experiments; only rather high concentrations were used in which the differences are smaller or not at all pronounced.

The results reported in this section show that the level of primary protection varies also under anaerobic conditions according to the prehistory of the yeast. The primary protection may be due to the formation of a symplex between the enzyme and a compound formed during the pre-treatment from added substrate.

The formation and also the maintenance of the protected unit seem to depend on energy yielding processes, respiration or fermentation. Under strictly anaerobic conditions no respiration or fermentation takes place at the expense of endogenous substrates. Due to this fact the protected unit changes and the level of protection is lowered. It is perhaps permissible to assume that a chemical change of the protecting compound is the cause of the decreased level of protection. It is now of interest to see in the experiments reported in this section that with prolonged maintenance under anaerobic conditions the level of protection further decreases. The interpretation is, we believe, that the protecting compound is further broken down or perhaps gradually dissociates from combination with the enzyme, leaving this in a more and more unprotected state. The unprotected state may perhaps be identical with an unfolded or reversibly denatured state of the enzyme molecule, the rôle of the protecting compound being the maintenance of the enzyme molecule in its native state. It is involved in this assumption that the activity of the enzyme is compatible with a slight degree of denaturation.

**8) Influence of pre-treatment on the inhibition of the anaerobic fermentation by fluoride added after the glucose.** In a number of experiments fed and unfed yeast were compared as to the inhibition of fermentation caused by fluoride added after the glucose. The results at first seem rather paradoxical but they have received confirmation by numerous repetitions under slightly varied conditions.

The pre-treatment with glucose and distilled water was carried out in exactly the same way as described above, p. 22. The yeast which has been submitted to a pre-treatment with glucose is denoted again as I, and the parallel samples, in which the glucose was replaced by distilled water are denoted as II.  $I_{10}$  and  $I_{50}$  denote that the yeast has been shaken in nitrogen 10 or 50 minutes before the addition of glucose. In the latter case addition of chromous chloride secured the more complete removal of traces of oxygen.

The A-values are given in the Table XVII.

TABLE XVII.

12 mg yeast per sample. Glucose concentration 23,2 mmol/l, gas space: nitrogen  $t=25^\circ$ .

No.			1	2	3	4	5
Fluoride conc. mmol/l . . . . .			0	37.5	50	62.5	75
$I_{10}$	A, $\mu$ l $O_2 \times$ min. . . . .	n	102,000 —	74,800 0.73	27,800 0.27	13,200 0.13	1,790 0.02
$II_{10}$	" " . . . . .	"	108,300 —	125,340 1.15	84,000 0.78	15,720 0.13	5,520 0.05
$I_{50}$	" " . . . . .	"	110,300 —	97,300 0.88	69,400 0.62	20,500 0.19	6,170 0.05
$II_{50}$	" " . . . . .	"	118,000 —	120,760 1.02	103,100 0.88	25,680 0.22	7,180 0.06

Duplicate estimations show that the values of this table should be regarded as certain within about  $\pm 8\%$ . The errors are somewhat greater in the strongly inhibited samples. There is no doubt however that there is a significant difference between  $I_{10}$  and  $II_{10}$  in the concentrations 87.5 and 50 mmol/l of fluoride. In the higher concentrations of fluoride the differences disappear as is usually observed. It is surprising that under these circumstances the fed yeast is more sensitive to fluoride than the unfed yeast. The shaking of the yeast under anaerobic conditions renders the yeast less sensitive to the fluoride, provided that the glucose is added before the fluoride. This is conspicuous above all in the case of the fed yeast, cf.  $I_{10}$  and  $I_{60}$ . For the unfed yeast the effect is more uncertain or at least much slighter.

The experiments  $I_{10}$  and  $II_{10}$  of Table XVIII were not carried out under strictly anaerobic conditions. Addition of chromous chloride did not, however, change the character of the result; in general the differences were more pronounced between the fed and unfed yeast when the anaerobic condition was more strictly adhered to. Even the fermentation rate of the fed yeast without fluoride was lowered in a significant way. In later experiments care was also taken to bring the fed yeast as soon as possible into the manometric flasks under nitrogen. Furthermore, the cells change while in the manometric flasks under nitrogen even if not shaken. The work was therefore carried out as rapidly as possible and a smaller number of apparatuses was used in the later experiments. The addition of the different components to the manometric flasks and the replacing of the air by nitrogen in six apparatuses could be made in 15 minutes. The following table gives the A-value for an experiment carried out under strictly anaerobic conditions and using the minimum time for the preparations.  $I_{10}$  means, as above, fed yeast shaken in the water-bath ( $25^\circ$ ) for 10 minutes,  $I_{60}$  the same yeast shaken for 60 minutes before the addition of glucose. Fluoride was added 10 minutes later.  $II_{10}$  and  $II_{60}$  are the corresponding designations for the unfed yeast (distilled water added during the pre-treatment instead of glucose).

TABLE XVIII.

12 mg yeast per sample. Glucose concentration 23.2 mmol/l, gas space: nitrogen,  $t=25^\circ$ .

No.			1	2	3
Fluoride conc. mmol/l . . . . .			0	37.5	50
$I_{10}$	A-value $\mu\text{l CO}_2 \times \text{min.}$ . . . .		88,800	8,400	0
		n	—	0.09	0
$I_{60}$	„		109,200	92,060	58,000
		„	—	0.84	0.35
$II_{10}$	„		122,700	119,600	88,600
		„	—	0.97	0.72
$II_{60}$	„		124,400	110,500	82,000
		„	—	0.89	0.66

The extremely great sensitivity of the fed yeast  $I_{10}$  is in striking contrast to the samples  $I_{60}$  in which a considerable protection has developed during the time of shaking in the water-bath. In the unfed yeast the protection is higher from the beginning ( $II_{10}$ ) than in the fed yeast subjected to shaking ( $I_{60}$ ). If there is any change in the II-yeast induced by shaking it is in the opposite direction to that in the I-yeast.

Similar experiments were carried out with normal yeast D5 from the factory and yeast starved by shaking in distilled water for 16 hours. A slightly greater sensitivity may prevail in



the normal than in the starved yeast, the fluoride being added 10 minutes after the addition of glucose. In Table XIX  $I_{10}$  means the normal,  $II_{10}$  the starved yeast, both have been shaken under strictly anaerobic conditions for 10 minutes before the addition of glucose.

TABLE XIX.

12 mg yeast per sample. Glucose concentration 23.2 m mol/l, gas space:nitrogen,  $t=25^\circ$ .

No.			1	2	3	4	5
Fluoride conc. m mol/l . . . . .			0	25	37.5	50	75
$I_{10}$	A, $\mu\text{l CO}_2 \times \text{min}$ . . . . .		155,800	158,700	157,500	114,260	4,920
		n	—	1.02	1.03	0.76	0.03
$II_{10}$	„ „ . . . . .		169,500	188,200	173,500	145,200	24,380
		„	—	1.1	1.02	0.86	0.14

As in experiments described above the yeast cells were also shaken under nitrogen for 50 minutes in the manometric flasks (chromous chloride added). Practically no difference was obtained as an effect of the period of shaking. The pronounced change of sensitivity due to shaking seems to be characteristic of the fed yeast.

The seemingly paradoxical results of this section are explicable on the basis of the ideas outlined in the preceding section. Following the pre-treatment with glucose protected units are built up. When the cells are brought under anaerobic conditions the enzyme is still in combination with the protecting compound. While the cells are shaken under anaerobic conditions in the absence of substrate the protecting compound is degraded; as a consequence of this the degree of protection is lowered. In the experiments reported in this section glucose was added to the cell suspension before the fluoride. On the addition of glucose fermentation as well as synthetic processes are induced. A protecting compound is formed which combines with the enzyme, thus conferring protection. This protection is maintained in a stationary state on account of the fermentation. In the building-up of fresh protected units the cells fed previously are at a disadvantage. The presence of the already degraded protecting compound here impedes the reaction with the freshly formed and more efficiently protecting compound. As a consequence the inhibition by fluoride added after the glucose is stronger in yeast fed previously than in the unfed yeast. As pointed out in the preceding section the protecting compound is removed, when the yeast is shaken under anaerobic conditions in absence of substrate. This is reflected in an experiment such as that of Table XVIII. The yeast fed previously was shaken for 60 minutes. When fluoride was added after the glucose, the protection was much stronger than in the same yeast which had been shaken only for 10 minutes, cf.  $I_{10}$  and  $I_{60}$  of Table XVIII. With increasing period the degraded protecting molecules have become dissociated from the enzyme. This is now able to react with the freshly formed protecting compound.

9) Addition of alcohol does not protect the anaerobic fermentation. Under aerobic conditions alcohol added before the fluoride exhibits a protecting influence against the inhibition cf. p. 16. In a number of further experiments alcohol 17 mmol/l was added to samples kept in nitrogen. Then the fluoride was added, and 5 or 10 minutes later the glucose. In some of the first experiments carried out the impression was gained that the alcohol protects somewhat even under anaerobic conditions. Two precautions were adopted in the subsequent experiments. A stricter anaerobiosis was adhered to: chromous chloride was added to the central cup of the manometric flasks, the suspensions were shaken in the water-bath for 30-50 minutes before the addition of fluoride, which was followed 5-10 minutes later by the addition of

glucose. Under these conditions no protection was prevailing, even when the suspension contained 17 mmol/l alcohol, before the addition of fluoride; on the contrary, a certain not always pronounced increase of the inhibition was observed when alcohol was present. One experiment may be described in more detail. The alcohol was added immediately before the joining of the flasks to the manometers, in order to prevent any aerobic formation of protective compound from the alcohol. The stationary rates were determined graphically and are given in Table XX.

TABLE XX.

20 mg yeast per sample Fluoride → Glucose conc. 23.2 mmol/l. Gas space: nitrogen.  
t = 25°.

No.		1	2	3	4	5	6	7
Fluoride conc. m mol/l. . . . .		0	6.3	8.4	12.5	16.7	25	37.5
Without alcohol . . . .	Stationary rate, $\mu\text{l CO}_2$ per min.	12.7	2.8	1.8	1.2	0.9	—	∞ 0
	n	—	0.22	0.14	0.10	0.07	—	0
With alcohol . . . . .	„ „	12	1.5	1.4	0.5	∞ 0	∞ 0	∞ 0
	„	—	0.12	0.11	0.04	∞ 0	∞ 0	∞ 0

With this experimental arrangement a protection conferred by the addition of alcohol would be easily detectable. Actually a certain increase of the inhibition is observed in the samples containing alcohol.

**10) The influence of yeast extract on the inhibition caused by fluoride.** The yeast extract has been prepared in the following way:

Fresh yeast was suspended in 2.8 volumes of hot water. The suspension was kept for 10 minutes at 85°. The yeast was centrifuged off, and the extract was submitted to a treatment similar to the first steps of preparing cozymase, cf. MYRBAÖCK 17). Lead acetate was added and the precipitate formed was filtered off. The filtrate was precipitated with mercuric acetate, the precipitate washed and resuspended, and the mercury removed with hydrogen sulfide. This extract is rich in nitrogenous compounds, activators and growth promoting substances. One of the activators is the Z-factor (18) which promotes the fermentation.

A particular experiment will now be reported: 0.8 ml. yeast-extract was added directly to the yeast suspension in the main compartment of the vessel. In all other respects the samples were prepared according to the standard procedure. Table XXI gives the results expressed as A-values.

Fig. 13 represents the  $\text{O}_2$ -consumption in the samples Ib, 1—4. In the sample 1 without fluoride an increase of the rate takes place about 100 minutes after the beginning of the experiment. This is just the opposite of what happens in samples without yeast extract, in which the rate somewhat decreases about the same time after the beginning of the experiment. During the first part of the curve the rate is about 6.5, after the upward inflection about 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . It is seen that the curves 2 and 3 break off 60—70 minutes from the

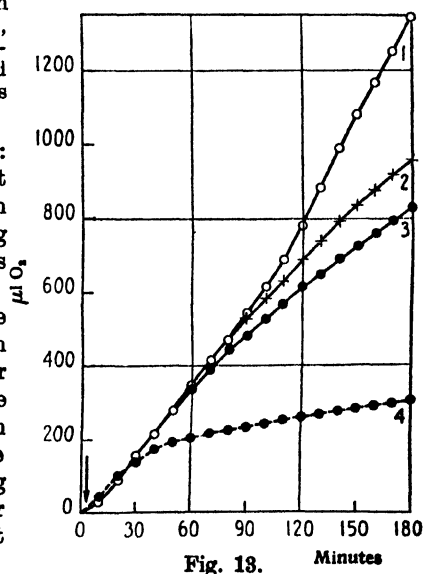


Fig. 13.

TABLE XXI.

Glucose  $\rightarrow$  fluoride 5 minutes; glucose conc. 23,2 mmol/l;  $t = 25^\circ$ .

No.			1	2	3	4
Fluoride conc. mmol/l $\rightarrow$ . . . . .			0	25	97.5	75
I. Respiration.						
a) Without addition of yeast extract . . . . .	A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{min.}$		83,000	86,600	81,000	81,400
		n	—	1.04	0.98	0.38
b) With yeast-extract added . . . . .	" "		105,800	90,500	81,000	38,400
		"	—	0.84	0.77	0.86
II. Aerobic fermentation.						
a) Without addition of yeast-extract . . . . .	A, $\mu\text{l CO}_2 \times \text{min.}$		29,500	92,700	31,700	11,600
		"	—	1.11	1.08	0.38
b) With yeast extract added . . . . .	" "		166,000	79,000	45,300	16,200
		"	—	0.47	0.27	0.1

beginning of the experiment. The rate is, after this time, considerably lower than the initial rate in control No. 1, namely about 5.0 and 8.6  $\mu\text{l}/\text{min}$  in No. 2 and 3 respectively. Evidently the fluoride not only impedes the increase of rate taking place

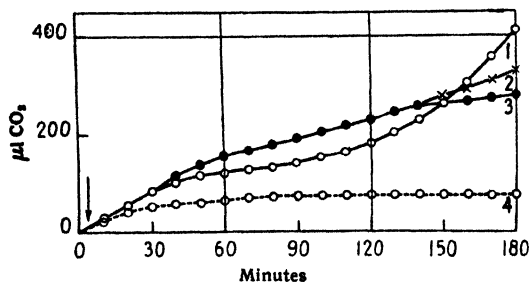


Fig. 14.

in the control, but when it has had a certain time to act, it decreases the rate to a value below the initial rate of the control (curve 1).

Fig. 14 and Fig. 15 give the sum curves of fermentation without and with the yeast extract (Table XXI, IIa and b). The strong increase of the fermentation following the addition of yeast extract is evident. The strong inhibition caused by

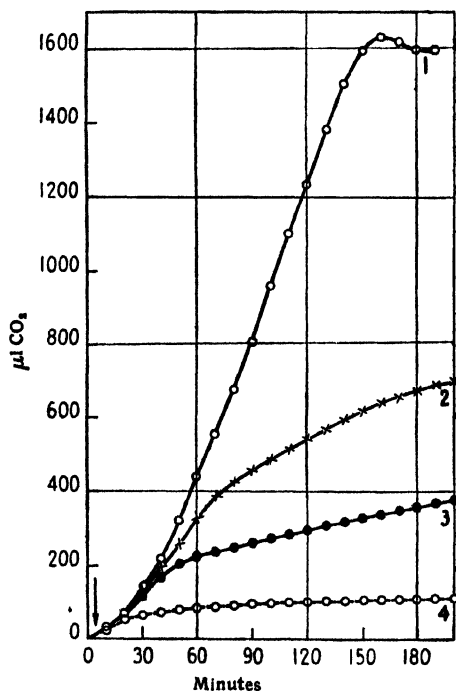


Fig. 15.

the fluoride is also striking. The curves showing the aerobic fermentation in the presence of fluoride separate almost immediately from the control curve (Fig. 15). Furthermore the curves soon break off more or less suddenly. All this shows that the degree of protection is very low in this case or we can formulate the conclusion: addition of yeast extract causes a decreased protection of the aerobic fermentation against fluoride in experiments of the type glucose  $\rightarrow$  fluoride.

The protection against fluoride conferred by substrate is much stronger under anaerobic conditions than in the samples kept aerobically to which yeast extract has been added, cf. Table XIV, II b. No inhibition was observed here until the experiment was carried out in the presence of concentrations of fluoride higher than 25 or 37.5 mmol/l. When the yeast concentration was 20 mg per sample even a rather strong stimulation was observed under anaerobic conditions in presence of 25 or 37.5 mmol/l fluoride in experiments of the type glucose  $\rightarrow$  fluoride, cf. above p. 20.

The effect which the yeast extract has on the sensitivity of the respiration towards fluoride is less pronounced than the effect on the fermentation.

In view of what has been reported above it seems paradoxical that addition of yeast extract confers a considerable protection when the fluoride is added before the glucose. The yeast extract was added, as above, directly to the yeast suspension before the joining of the flasks to the manometers. About 15 minutes later the fluoride, and after a further 10 minutes period the glucose (23.2 mmol/l), was added. In a control without yeast extract the inhibition was complete in the fluoride concentration 50 mmol/l. In the presence of yeast extract a considerable residual respiration was still found in this fluoride concentration,  $n$  being  $\approx 0.5$ – $0.6$ .

The yeast extract contains some substrate which is oxidised but not fermented by the cells. This substrate, as was found by Mr. K. BRANDT cannot be completely removed even by Cu-Ca-precipitation. The substrate increases the respiration in the yeast several hundred percent for a certain time. As a consequence of this involuntary addition of an oxidisable substrate, the protection against fluoride is increased.

It is indeed probable that the yeast extract does not in itself decrease the protection against fluoride. When yeast extract + glucose is added a state is induced in the cells which gradually results in growth and budding. Yeast extract alone does not induce this state, which before any bud formation, reveals itself through characteristic metabolic and structural changes, cf. CASPERSSON and BRANDT<sup>19</sup>). It is therefore probable that the decreased protection is due to changes which are subsequent to the induction of growth.

Some further experiments showed that a pre-treatment of starved yeast with glucose + yeast extract or alcohol + yeast extract gives a level of protection which both in respiration and aerobic fermentation is considerably lower than the level of protection in starved yeast pre-treated with glucose or alcohol alone according to the procedure described above, p. 12.

The final experiments were of the type glucose  $\rightarrow$  fluoride. In the cells pre-treated with yeast extract + glucose or alcohol practically all the cells were in a state of budding while only few buds were observed when the cells had been pre-treated with alcohol or glucose alone. The aerobic fermentation is not increased, when the yeast has been pre-treated with yeast extract + glucose washed and resuspended in s.s.-buffer solution without yeast extract. Only under the direct action of this latter is the strongly enhanced fermentation shown in Fig. 15 observed. No details will be given here of the experiments with the pre-treated yeast. They have been briefly mentioned as they confirm that the state of growth rather than the presence of yeast extract confers the decrease of protection against fluoride.

**11) The influence of ammonia on the inhibition caused by fluoride.** The addition of  $\text{NH}_4$ -salts has a similar influence on the aerobic fermentation to that of yeast extract. This has been found already by ZELLER<sup>20</sup>) and has been confirmed by SMYTHE<sup>21</sup>). A detailed study of this phenomenon has been carried out in our laboratory, cf. RUNNSTRÖM, BRANDT, and MARCUSE<sup>22</sup>). Here we shall only show that the addition of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to a suspension of normal yeast lowers the level of protection against fluoride. The samples were

TABLE XXII.

Glucose  $\rightarrow$  fluoride interval 10 minutes. Glucose conc. 23.2 mmol/l;  $t = 25^\circ$ .

No.				1	2	3
Fluoride conc. mmol/l . . . . .				0	37.5	75
I. Respiration.						
a) $\text{NH}_4\text{Cl}$	O . . . .	A, $\mu\text{l O}_2 \times \text{min.}$		87,400	88,600	21,300
			n	—	1	0.24
b) „	3.5 mmol/l .	„ „	„	79,600	75,200	25,700
				—	0.94	0.32
II. Fermentation.						
a) $\text{NH}_4\text{Cl}$	O . . . .	„ „		13,300	25,000	8,700
			„	—	1.87	0.65
b) „	3.5 mmol/l .	„ „		94,000	52,600	9,500
			„	—	0.56	0.10

made up in the usual way. The concentration of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , added directly to the yeast suspension in the main compartment, was 3.5 mmol/l.

The fermentation is seen to be much increased on addition of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; at the same time a strong inhibition is caused by fluoride. According to the data of Table XXII the level of protection in respiration does not seem affected by the addition of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . In the control without

$\text{NH}_4\text{Cl}$  the curves corresponding to the samples without and with 37.5 mmol/l fluoride practically coincided. Fig. 16 shows the curves for the respiration in the samples with addition of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . It is obvious that the courses of curve 1 (no fluoride) and curve 2 (with 37.5 mmol/l fluoride) are rather diffe-

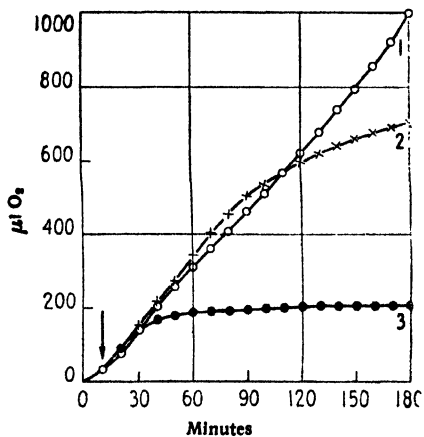


Fig. 16.

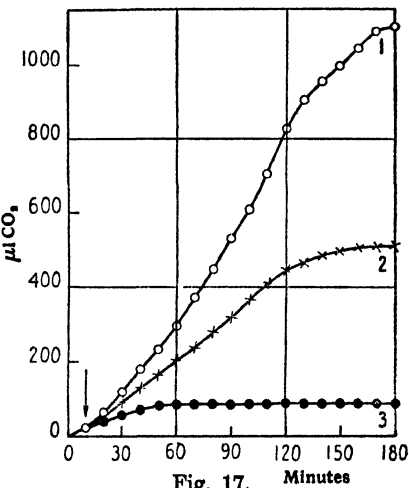


Fig. 17.

rent. In the curve 2 a stimulation of the respiration in respect to the control is observed. About 80 minutes after the addition of fluoride the curve 2 breaks off rather suddenly. The rate decreases from about  $6 \mu\text{l O}_2/\text{min.}$  to  $2.5 \mu\text{l O}_2/\text{min.}$  and further. This curve shows that the inhibition is more pronounced than that indicated by the A-value.

The curves representing the aerobic fermentation in absence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , (Table XXII IIa) were almost identical with the curves 1, 3 and 4 of Fig. 14. The control curve presented a very

marked „secondary fermentation”, cf. above p. 7. In the presence of 35.7 mmol/l fluoride (Table XXII IIa No. 2) a considerable stimulation is shown, but the rate of the secondary fermentation of the control finally arrives at values which are higher than the rate of No. 2, cf. curve 1 Fig. 14, which finally cuts the curve 3 (37.5 mmol/l fluoride). The inhibition in IIa, No. 3, involves chiefly a suppression of this secondary fermentation.

Fig. 17 gives the fermentation in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . The curves are found to separate from the beginning in this case as on the addition of yeast extract cf. fig. 15. The curves 2 and 3 break off after a longer or shorter time which corresponds to a complete inhibition of the fermentation. In the curves 1 and 2 a certain rise of the rate of fermentation is observed about 90 minutes after the commencement of the experiment. This rise is due to growth and budding induced by the presence of glucose +  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . It is assumed that this is also the cause of the decreased level of protection manifested above all in fermentation in the presence of glucose +  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

**12) The inhibition of respiration and fermentation by fluoride in the presence of cystein and thioglycollic acid.** It has been inferred above that addition of yeast extract or  $\text{NH}_4\text{Cl}$  has a promoting effect on the inhibition caused by fluoride. One objection may be raised however against this inference. The aerobic fermentation might in itself be more sensitive to fluoride than the respiration. This sensitivity does not perhaps manifest itself before the fermentation has arrived at its maximum. This objection would be in keeping with the explanation given above, p. 7, of the fermentation conferred by the addition of fluoride, when the fermentation or respiration is low.

The addition of cystein has already been referred to above as a method of promoting the aerobic fermentation, p. 17 and (13). In one experiment the cystein concentration amounted to 0.2 mmol/l. The glucose, 23.2 mmol/l, was added five minutes before the fluoride. The A-value for the fermentation increased from 11.000 to 175.000 under the influence of cystein (while the A-value for respiration decreased from 86.500 to 39.000). In the fluoride concentrations 37.5 and 50 mmol/l no inhibition of the fermentation, but on the contrary a slight stimulation, was observed ( $n \sim 1.02$ ). Only in the fluoride concentrations 75 and 125 mmol/l did the n-values decrease to 0.16 and 0.03 respectively \*). In the experiment with yeast extract, on the other hand, the inhibition of the aerobic fermentation was strong ( $n = 0.47$ ) even at the fluoride concentration 25 mmol/l, cf. Table XXI, IIb 2.

Also in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Table XXII), a strong inhibition of the aerobic fermentation was caused by 37.5 mmol/l fluoride. Consequently the level of protection is lower than in the experiments with added cystein. At higher fluoride values the differences disappear. This phenomenon has often been observed, for instance when comparing fed and unfed yeast, cf. table VII, p. 13.

In Fig. 18 curve 1, the quotient  $\frac{1-n}{n}$ , the inhibition over the remaining fermentation, has been plotted for the

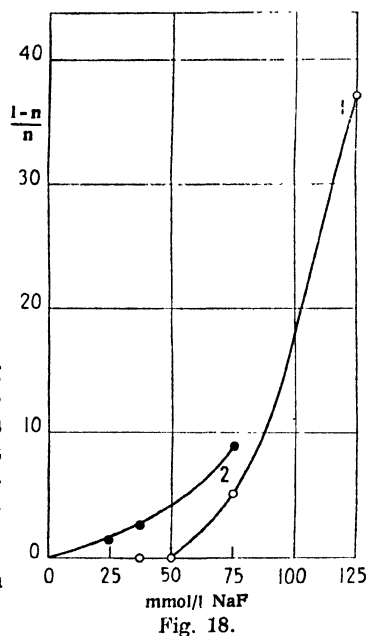


Fig. 18.

\*) The influence of the fluoride on the respiration in presence of cystein is of minor importance for our discussion. As mentioned above the respiration is considerably lowered on addition of cystein. In the presence of cystein and 37.5 of 50 mmol/l fluoride the respiration was stimulated ( $n = 1.06$  and 1.3 respectively, the corresponding n-values without cystein 1.00 and 0.75). In the higher fluoride concentrations, 75 and 125 mmol/l, an inhibition is observed ( $n = 0.68$  and 0.19 in presence of cystein, 0.32 and 0.07 in corresponding samples without cystein).

cystein experiment just mentioned. Curve 2 gives the same function for the experiment with yeast extract (Table XXI). The last value of curve 1 is somewhat uncertain in view of the great change of the value of the quotient with a small change of  $n$ . The corresponding value of curve 2 is lacking but no doubt the curves will practically converge at higher values of  $\frac{1-n}{n}$ . The general shape of these curves is similar for respiration and fermentation. Their interpretation will be discussed below, p. 86.

It is clear from the cystein experiment that an increase of fermentation does not in itself increase the sensitivity towards fluoride. In the experiment with yeast extract or  $\text{NH}_4\text{Cl}$  the level of protection is decreased on account of a specific change in the cells, the induction of growth. The addition of cystein does not induce growth.

Table XXIII gives an example on the influence of thioglycollic acid \*) on the inhibition conferred by fluoride. The thioglycollic acid was added directly to the yeast suspension in the main compartment of the manometric flask to give a concentration of 4 mmol/l. The experiment with thioglycollic acid reported refers to the same material as does Table XXI. The control values given in Table XXIII are therefore the same as in Table XXI, Ia and IIa.

TABLE XXIII.

Glucose  $\rightarrow$  Fluoride interval 5 minutes. Glucose conc. 23.2 mmol/l,  $t = 25^\circ$ .

No.			1	2	3	4
Fluoride conc mmol/l .....			0	25	37.5	75
I. Respiration.						
a) Thioglycollic acid mmol/l	0	$A, \mu\text{l O}_2 \times \text{min.}$	83,000	86,600	81,000	31,400
		$n$	—	1.04	0.98	0.38
b) " " "	4	" "	64,000	50,000	44,300	23,000
		$n$	—	0.78	0.70	0.36
II. Fermentation.						
a) Thioglycollic acid mmol/l	0	" "	29,500	33,000	32,000	11,600
		$n$	—	1.10	1.07	0.39
b) " " "	4	" "	41,000	82,400	82,400	19,100
		$n$	—	$\sim 2$	$\sim 2$	0.47

Thioglycollic acid decreases the rate of respiration even in the absence of fluoride; the effect is, however, much less marked than that which ensues on the addition of cystein even in much lower concentrations. The addition of thioglycollic acid above all decreases the protection against fluoride.

As for the respiration, this is made clearer by Fig. 19 representing the respiration in the presence of thioglycollic acid. In the case of the two lower fluoride concentrations it is evident that the curves break off very early, after about 20 minutes. The decrease of rate, however, proceeds gradually and slowly. In the lowest fluoride concentration an initial stimulation in

\*) A pure preparation of this substance was kindly supplied by Professor BROR HOLMBERG.

relation to the control without fluoride is observed. The curve 4, representing the respiration in the presence of the highest fluoride concentration separates very early from the control curve 1 without fluoride. This is in striking contrast to the situation in the samples with no thioglycollic acid added. The curve corresponding to an addition of 75 mmol/l fluoride practically coincides for a period of 80 minutes with the control curve for no added fluoride. Now the break sets in earlier and more abruptly than in the samples with thioglycollic acid present. It is evident from this that certain rather qualitative differences are present which are not expressed in the values of A.

The closer study of the curves, however, confirms and underlines the conclusions drawn from the calculation of the A-values: the addition of thioglycollic acid reduces the protection from the normal to a certain lower level.

A curve giving  $\frac{1-n}{n}$  as a function of the fluoride concentration would be of the more abrupt type (cf. Fig. 18, 1) in the case of the samples without thioglycollic acid, whereas a more continuous curve (cf. Fig. 19, 2) would be given by plotting the values for the samples with thioglycollic acid.

The curves of Fig. 20 represent the fermentation in the presence of thioglycollic acid. Curve 1 referring to a sample without fluoride (Table XXIII, IIb No. 1) does not show in the beginning any difference from a control sample without thioglycollic acid. Just as in many control samples (cf. Fig. 2 and 14, curve 1), however, a secondary increase of fermentation occurred in the sample to which Fig. 20, curve 1, refers. This secondary

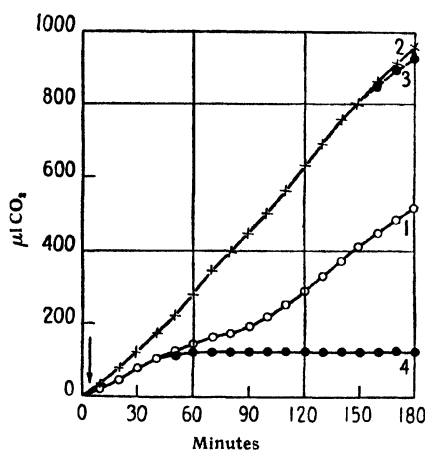


Fig. 20.

acid, on the other hand, seems to affect more greatly the sensitivity of respiration towards fluoride. It is possible that a difference in character between the enzyme acting in the respiration and that acting in the fermentation forms the background for the differences of reaction which have been described.

#### IV. Discussion.

In the foregoing sections it has been shown how the ideas of primary protection and additional protection form a useful basis for understanding the behaviour of respiration and fermentation in the presence of fluoride. It has further been stated cf. p. 2 that we have to deal with two different fluoride sensitive enzymes, one of these is a carrier in the chain of

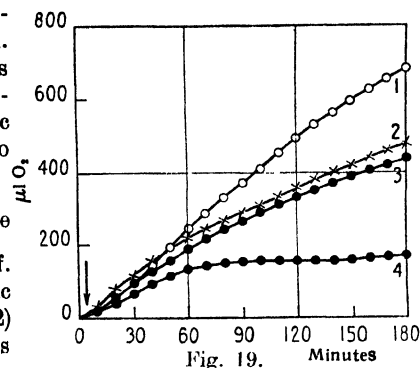


Fig. 19.

increase of fermentation, however, sets in earlier than in the control sample cf. Fig. 2 and 14, curve 1. Thus the A-value of curve 1, Fig. 20 (Table XXIII, IIb No. 1) is considerably greater than the A-value of the corresponding control (IIa No. 1). In the fluoride concentrations 25 and 37.5 mmol/l fluoride (Fig. 20 curves 2 and 3) a strong stimulation of the fermentation occurred. Only in the highest concentration of fluoride (Fig. 20, curve 4) is an inhibition observed. This inhibition, however, is not pronounced during the first hour of the experiment; it really indicates a suppression of the secondary fermentation.

It is obvious that the nature of the influence of thioglycollic acid on the fluoride inhibition is quite different from that conferred by yeast extract or ammonium chloride. These two last named agents have most markedly affected the fluoride inhibition of the fermentation. The addition of thioglycollic



respiratory enzymes (4-6), the second one is an enolase acting as a link in the fermentation (7).

If we now attempt to give a more detailed interpretation, we find at once the simplest molecular mechanism that we can think of is capable of accounting in a general way for most of the experimental results. We know, on the other hand, that the processes taking place in living cells are complicated; it is therefore likely that this simplest mechanism is too simple. In this section it seems best then to carry out the discussion in two stages: we shall (A) discuss the simplest molecular mechanism, and (B) consider whether certain more complicated processes are perhaps more satisfactory and nearer to the truth.

(A). We start from the idea that the inhibitor can react only with the small fraction of the enzyme molecules which happen to be unprotected at the moment, and we may write down the ideas which seem the most natural to entertain about such a process.

(1) An enzyme molecule is protected when one or more of the protecting molecules combine with it to form a compound molecule, which may be called a „*protected unit*”.

(2) When such a protected unit happens to be thermally dissociated, an unprotected molecule is formed for the time being.

(3) An enzyme molecule is temporarily inactivated when one, or a sufficient number \*) of inhibitor molecules, or ions, has combined with it to form a compound molecule, which may be called an „*inactivated unit*”. When such a unit happens to be thermally dissociated, a free enzyme is likewise formed for the time being.

(4) If the enzyme molecule is capable of protection by one substance, then it is likely that other similar substances will also confer protection.

(5) In the absence of any protecting substance the action of the inhibitor would not be slow, but would be as rapid as in most familiar cases of inhibition; the activity of the enzyme would quickly adopt that value which is appropriate to the concentration of the added inhibitor.

(6) If the living cell necessarily contains a substance which is a protector of this enzyme, nearly all the enzyme molecules will be found in combination with molecules of this natural or primary protector. One may begin by assuming that the cell contains only one such protecting substance, and that none of it is destroyed during the experiment.

(7) When thermal dissociation of such a protected unit takes place, the enzyme molecule spends a short time in the unprotected state, before it becomes protected again. The average length of this interval depends on the concentration of the protecting molecules in solution; the higher the concentration, the shorter the interval.

(8) In the presence of an inhibitor, whenever dissociation of a protected unit takes place, the inhibitor has an opportunity of attacking the enzyme molecule during the short interval before it becomes protected again. Whether one or more inhibitor molecules succeed in combining with the unprotected enzyme molecule during this interval depends on the concentration of the inhibitor in solution; the higher the concentration of the inhibitor, the fewer the opportunities that are missed.

(9) If the average lifetime of a protected unit before thermal dissociation is more than a few seconds, we shall find that inhibition develops slowly, even when a high concentration of inhibitor has been added; the inhibitor cannot attack an enzyme molecule until it becomes unprotected. On the other hand, if the average lifetime of the protected unit is a small fraction of a second, we shall find only a slow inactivation when the concentration of the inhibitor is low; this slowness will be due to the fact that many opportunities of attack are being missed; and with high concentrations of inhibitor the inactivation will be rapid.

We can discuss now how the activity of the enzyme would behave if these simple assumptions were true. With regard to (9) the lifetime of both the protected units is short in the case of yeast, since a high concentration of fluoride gives a rapid inhibition of both respiration and fermentation. The lifetime of the inactivated unit appears to be longer.

In section III, 2 it was shown that when a high concentration of glucose is present the effects

\*) cf. below p. 86.

are independent of the concentration of glucose. Thus, although the amount of glucose is falling throughout the experiment, we may give a preliminary discussion treating the concentration of added glucose as constant. Figs 21a, b and c are intended to illustrate the behaviour expected when the fluoride is added before the substrate. In all three figures let the abscissae be the times that have elapsed since the addition of fluoride. In fig. 21a let the ordinates be numbers of inactivated molecules; and in fig. 21b and c let the ordinates be the total activities of the enzyme present.

When the fluoride is added the number of inactivated molecules rises from zero, as suggested by the curve AB, and tends to a final equilibrium represented by the horizontal line CD. We are going to consider the experiment where, after a certain interval, glucose will be added at a concentration  $c$ . In the final equilibrium some of the enzyme molecules will combine with the additional protector; hence the final equilibrium will contain fewer inactivated molecules; let the value be that indicated by the horizontal line EF.

The glucose may be added at any time. Up to the time when the glucose is added, a part of the curve AB is followed. But when the glucose is added, it checks the inactivation, and the curve AB is no longer followed. For the sake of illustration a suggested time-scale has been indicated in the diagram. If the glucose is added after 5 minutes, the point G on the curve AB has just been reached. In this case the number of inactivated molecules is less than the value demanded by the final equilibrium (represented by the line EF). On the other hand, if the glucose is added after 10 minutes, the point H will have just been reached. Now H lies almost on the line FE produced; the number of molecules already inactivated is nearly equal to that required for the final equilibrium; hence scarcely any further change is demanded. The curve in fig. 21b shows how we expect the activity of the enzyme to behave in this case; the inactivation would have followed the broken curve, but when the glucose is added (after 10 minutes as shown by the arrow)

the inactivation is checked and we observe an almost constant rate of respiration; (the activity of the enzyme before the addition of glucose is of course not accessible to observation).

Finally Fig. 21c shows the behaviour expected for starved yeast, when the same concentration of fluoride has been added. The amount of primary protector is smaller, and the attack is more rapid. If no additional protector were added, the activity would fall to a low value, following the broken curve. If a large amount of additional protector is added, however, the final equilibrium demands a larger number of protected and active molecules. Instead of following the broken curve, the activity rises as soon as the glucose has diffused into the cells and then approaches a constant value. We see then that when the primary protection of the cells

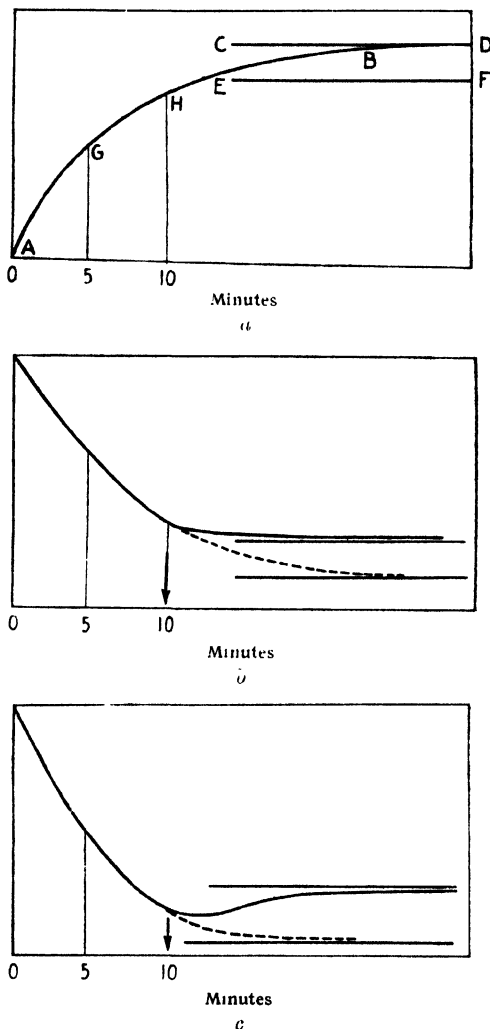
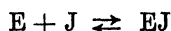


Fig. 21.

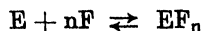
is low, we may expect a recovery of the activity. This is just the effect which has been reported above in Fig. 4 for respiration and in Fig. 12 for fermentation.

We have hitherto been considering the activity of the enzyme which is sensitive to fluoride. The process catalysed by this enzyme forms one link in a long reaction-chain; we need to know how the rate of reaction for the whole chain depends on the rate at this particular link. As it is hoped to publish elsewhere a discussion of this problem, we shall not consider the details here. In a recent note on the master reaction in oxidation chains<sup>(23)</sup> it has been shown that the slowest link in the chain usually combines with one or both adjacent links to determine the rate of reaction for the whole chain. To predict the behaviour of the respiration (or fermentation), the activity of the enzyme pictured in Figs. 21 b and c needs to be translated into rate of reaction for the whole chain; we cannot assume that one is simply proportional to the other. The departure from simple proportionality may be either small or large; thus two different lines of interpretation are open to us.

This is specially important when discussing how the inactivation depends on the concentration of fluoride. With the better known inhibitors of respiration, CN and CO, the degree of inactivation is not very sensitive to small changes in the concentration of the inhibitor. With fluoride, on the other hand, the inhibition of respiration seems to vary as a high power of the concentration, cf. Fig. 18. This difference between fluoride and CN may perhaps be ascribed to the fact that the links adjacent to the fluoride-sensitive link are of a different character from those adjacent to the link which is cyanide-sensitive. On the other hand, it seems more likely that the difference is to be ascribed to the fact that in the case of fluoride the reaction between inhibitor and enzyme molecule is of a different character from that found with CN and CO. In the case of CO WARBURG<sup>9)</sup> was able to assume that one molecule of the inhibitor combines with one molecule of the enzyme (and the work of WINZLER<sup>24)</sup> in this institute shows that this assumption is undoubtedly correct). The behaviour of fluoride appears to be quite different. A high concentration will produce in three seconds as much inactivation as a rather lower concentration will produce in ten minutes. Apparently the inactivation of the enzyme molecule cannot arise from a simple union with either one fluoride atom or ion, or even with two, or three. Let J denote the molecule, or ion, or atomic group which actually combines with and inactivates the enzyme molecule E, thus



We can account for the experimental results if the concentration of J varies as a high power of the fluoride concentration. In low concentrations of F comparatively few molecules of J are present, but in high concentrations of F they are plentiful. At the same time the experimental behaviour is consistent with a simple union between E and several atoms of F\*), thus



In low concentrations of F the probability for the rapid formation of  $EF_n$  molecules is small; but in high concentrations the probability will be much larger.

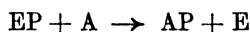
There seems little doubt that, if we could observe the inhibition by fluoride in the absence of the primary protector, we should find a similar behaviour in the degree of inhibition that is to say, the cause underlying the concentration effect has no connexion with the protection. The two phenomena appear to be quite separate and distinct. (In the case of protection studied by DIXON and KEILIN<sup>26)</sup> there was only a normal slow variation with the concentration of the inhibitor). We shall return later to the discussion of this effect of concentration.

(B) We may pass on now to the second stage of the interpretation. We have hitherto been neglecting as far as possible the fact that the process is taking place in the interior of living cells. We have been merely considering the interplay between three molecular species, the enzyme, the inhibitor and the protector molecules. We have supposed that the protector was a thoroughly stable substance, which did not take part in any other reaction during the experi-

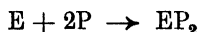
\*) cf. LIPMANN<sup>25)</sup> who arrived at the same conclusion in work with maceration juice from yeast and with minced muscle.

ment. In a living cell, however, it seems very likely that the molecular species which protects is not at all such an inert substance, but that it is itself undergoing changes such as breakdown and synthesis. And further, the combination between protector and enzyme may be a step in this process, and not a mere accidental combination, as we have been treating it. This suggestion involves the idea that the enzyme in question carries on two functions simultaneously. In respiration the principal function of the enzyme is to behave as a member of the oxidation chain; we suggest that at the same time it catalyses some reaction of the protector molecules. (The same suggestion applies to the other enzyme whose principal function is to behave as a member of the fermentation reaction chain).

Consider now how this conception may affect the rate of inactivation by fluoride, for which the determining factors are (a) the lifetime of the protected unit EP, and (b) the length of the interval which the enzyme molecule spends in the free unprotected state E. We supposed above that combination  $E + P \rightarrow EP$  was followed by simple thermal dissociation. The conversion of protected unit into free unprotected molecule may, however, equally well come about by a reaction of the type



We do not have to alter any of the fundamental ideas; we can still deal with the lifetime of the protected unit EP, and with the interval which the enzyme spends in the free unprotected state E. The difference is that in this case the life time of EP depends on the concentration of A. Alternatively, suppose that the protected unit is formed by



Thermal dissociation of the protected unit may lead to



In this case too there is a functional relationship between the enzyme and the protector. Further experimental work is needed to test these ideas.

We have not yet paid much attention to the nature of the additional protection which is superimposed on the primary protection when glucose is added. If we find that the rate of inactivation is much retarded, this may have come about in two different ways. It may be that the lifetime of the protected unit has been prolonged, so that opportunities for attack occur less frequently. Or it may be that the average time spent in the unprotected state is shortened owing to the higher concentration of protector in solution. The former effect would occur if the additional protector molecules attach themselves to the existing protected units, thereby forming a still more stable protected unit. Perhaps both these processes occur simultaneously. The unchanged glucose molecules may have some protecting effect, or the whole protective action may be contributed by molecular species rapidly formed from the glucose. It follows from the data presented in section III, 5 that protection is conferred also by addition of pyruvic acid, alcohol etc. Consequently a protecting compound can be formed from different sources. It must be left undecided if the same compound is always formed.

In the case of the inhibitory action of fluoride substrates confer additional protection only if they are oxidized or fermented in the cell. Arabinose which is not attacked by the oxidation does not protect under aerobic condition, cf. p. 19. Under strictly anaerobic conditions alcohol does not protect; under these conditions alcohol is not attacked. Under aerobic conditions the alcohol is oxidized and now it exhibits a strongly protecting action. The oxidation or fermentation splits the molecules and by this they give rise to substances from which the protector may be formed. At the same time they give the energy to the synthesis which probably is necessary with the split products serving as material. If we knew the chemical nature of the protector this could perhaps be introduced into the cell and react directly with the enzyme. But on the other hand the anaerobic experiments cf. sections III 6—8, prove that the protector is changed and gradually dissociates off from the enzyme molecule if respiration and fermentation are not proceeding in the cell.

In the preliminary discussion, cf. above p. 24 the conclusion was already drawn that

both the formation and the maintenance of the protected unit is dependent on respiration or fermentation.

LIPMANN<sup>25)</sup> has considered the possibility that the fluoride-sensitive enzyme contains a metal, such as iron, and that the inactivation is due to the combination of fluoride with this metal in the molecule. According to this view the inactivation would be a process very similar to the well-known inhibition of respiration by cyanide, in which the cyanide is believed to combine with the oxidized form of an enzyme containing iron. In this section we have, however, contrasted the behaviour of fluoride with that of cyanide, since the observed dependence on the concentration of the inhibitor is quite different, and points to the formation of a compound of a different character \*). It is possible that the inactivation by fluoride is due to an attack on the protein of the enzyme molecule. According to MIRSKY and PAULING<sup>27)</sup> hydrogen bonds play an important role in the configuration of the native protein molecule, denaturation being the result of the breaking of hydrogen bonds. Now fluorine is said to have a great capacity of forming hydrogen bonds; and the stability of the negative ion  $F-H-F'$ , present in a solution of hydrofluoric acid, is ascribed to the formation of a hydrogen bond, cf. MÜLLER<sup>28)</sup>. It seems possible then that the inactivation by fluoride arises from an attack on the enzyme molecule by several molecules or ions containing fluoride, which form loose hydrogen bonds with the protein, thereby temporarily breaking up existing bonds in the native enzyme molecule.

### Summary.

Two different enzymes in bakers yeast are largely subject to fluoride inhibition: 1) a link in the respiratory chain with a normal potential not far from that of cytochrome b, 2) a link in the fermentation enzyme chain, probably the enolase acting in the transformation 2-phosphoglyceric  $\rightleftharpoons$  phosphopyruvic acid. In respect to the fluoride inhibition these enzymes behave in a very similar way.

Under different physiological conditions the enzymes in question present different levels of protection against fluoride. It is inferred from numerous data that a „*protected unit*” is formed by a combination of the enzyme proper with a compound formed from added substrate.

It is inferred that the degree of inhibition by fluoride depends on the lifetime of the protected unit in relation to the lifetime of the enzyme-fluoride compound.

Only substances which are attacked by respiration or fermentation are able to serve as a material for the formation of the protecting compound.

If neither respiration nor fermentation proceeds in the cell the protection decreases due to a change in the protecting compound.

Thus both the formation and the maintenance of the protected unit depend on respiration or fermentation.

The inhibition caused by fluoride increases from 0 to 100% within a comparatively narrow range of concentrations. This is in favour of the idea that several fluoride molecules or ions react with every enzyme molecule.

It is admitted as possible that the protecting compound also forms a link in synthetic processes within the cell. This would explain the fact that in growing and budding cells the level of protection is considerably lowered in fermentation and to a smaller extent also in respiration.

\*) In a previous paper (4) the metal complex hypothesis was discussed and the possibility was considered of explaining the protection by added substrate on this basis (i.e. p. 23, foot note). From a consideration of equation (1) of KLEIN and RUNNSTRÖM<sup>29)</sup> it is evident however that the protection can not be explained in this way even if the fluoride-sensitive enzyme is an oxydation-reduction system.

We are grateful to Mrs. ASTRI RUNNSTRÖM for the generous and valuable help with the numerous manometric experiments carried out during the course of this research.

This work has been aided by grants from „The Rockefeller Foundation”, „Wenner-Grenska Samfundet” and „Svenska Jästfabriks Aktiebolaget”.

- 1) R. Willstätter, M. Rohdewald, *Enzymol.* **8**, 1 (1940). — 2) J. Runnström, E. Sperber, *Bioch. Zs.* **298**, 340 (1938). — 3) M. Malm, *Naturwiss.* **28**, 723 (1940). — 4) J. Runnström, H. Borei, E. Sperber, *Ark. f. Kemi* **13 A**, nr. 22 (1939). — 5) H. Borei, *ibid.*, **13 A**, nr. 23 (1939). — 6) H. Borei, Unpublished data. — 7) O. Meyerhof, *Erg. Physiol.* **89**, 10 (1937). — 8) E. Sperber, J. Runnström, *Bioch. Zs.* **300**, 373 (1939). — 9) O. Warburg, *Katalyt. Wirk. der lebenden Substanz*, Berlin 1928. — 10) E. Wertheimer, *Protopl.* **21**, 522 (1934). — 11) C. F. Cori, *Cold Spring Harbor Symp. on quant. Biol.* **7**, 260 (1939). — 12) J. Runnström, E. Sperber, E. Karlsson, *Ark. f. Kemi* **13 B**, nr. 10 (1939). — 13) J. H. Quastel, A. Wheatley, *Biochem. J.* **26**, 2169 (1932). — 14) T. B. J. Stier, J. N. Stannard, *Jl. of gen. Phys.* **20**, 461 (1936). — 15) K. Myrbäck, *Bioch. Zs.* **288**, 329 (1936). — 16) O. Warburg, F. Kubowitz, W. Christian, *Bioch. Zs.* **242**, 170 (1931). — 17) K. Myrback, *Erg. d. Enzymforschung* **2**, 139 (1933). — 18) H. v. Euler, H. Cassel, *Zs. physiol. Chem.* **86**, 122 (1913). — 19) T. Caspersson, K. Brandt, *Protopl.* 1941 (in press). — 20) H. Zeller, *Bioch. Zs.* **266**, 367 (1933). — 21) C. V. Smythe, *Enzymol.* **6**, 9 (1939). — 22) J. Runnström, K. Brandt, R. Marcuse, *Ark. f. Kemi* **14 B**, nr. 8 (1940). — 23) R. Gurney, *Ark. f. Kemi* **14 B**, nr. 17 (1940). — 24) R. Winzler, Unpublished data. — 25) F. Lipmann, *Bioch. Zs.* **206**, 171 (1929). — 26) M. Dixon, D. Keilin, *Proc. Roy. Soc. (London)* **B**, **119**, 159 (1936). — 27) A. Mirsky, L. Pauling, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **22**, 439 (1936). — 28) E. Müller, *Neuere Anschauungen der organischen Chemie. Org. Chemie in Einzeldarstellungen*, Bd. I, Berlin 1940. — 29) O. Klein, J. Runnström, *Ark. f. Kemi* **14 A**, nr. 4 (1940).

# Über die Glucosedehydrasen \*)

VON

D. MÜLLER

(Pflanzenphysiol. Lab. der kgl. tierärztl. und landwirtschaftl.  
Hochsch., Kopenhagen).

(20.I.41).

**1. Einleitung.** Bis jetzt sind drei verschiedene zellfrei gefundene Enzyme bekannt, die unphosphorylierte Glucose direkt, und zwar zu Gluconsäure, oxydieren: Die sog. „Glucoseoxydase“ aus *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* (MÜLLER<sup>1</sup>), die Glucosedehydrase aus Säugetierleber (HARRISON<sup>2</sup>) und die Glucosedehydrase aus *Aspergillus oryzae* (OGURA<sup>3</sup>). Ausserdem haben FRANKE u. BANERJEE<sup>4</sup> gefunden, dass Gefrier-saft und Autolysat aus *Bact. coli* mit Glucose als Donator Methylenblau entfärbt, aber solange nicht Produkte isoliert sind, ist es unsicher, ob die Glucose direkt oder erst nach Spaltung oder Phosphorylierung dehydriert wird.

**Donatorspezifität.** Die sog. Glucoseoxydase aus *A.n.* dehydriert spezifisch Glucose > Galactose > Mannose (MÜLLER<sup>1</sup>). Die Glucosedehydrase aus *A.o.* dehydriert Glucose > Xylose > Mannose und Galactose (OGURA<sup>3</sup>). Doch lautet folgende Angabe OGURA's sonderbar: „Wenn das Enzympräparat—dialysierter Presssaft—3 Tage lang bei 0° im Eisschrank belassen wurde, verlor es die Fähigkeit zur Dehydrierung von Mannose und Galactose, während Glucose und Xylose noch dehydriert werden“. Die Glucosedehydrase aus Säugetierleber dehydriert Glucose. Galactose und Arabinose „showed no appreciable reduction of methylene blue except in high concentrations, and it is not unlikely that the slow reduction which then occurred was due to traces of glucose present as an impurity in the sugars“ (HARRISON 1931).

Der Unterschied in den Angaben über die Donatorspezifität der drei Enzyme hat den untenstehenden Vergleich veranlasst.

**Acceptorspezifität.** Die drei Enzyme sind acceptorverschieden. Die sog. Glucoseoxydase vermag sowohl O<sub>2</sub> wie einige Redoxindikatoren zu reduzieren, nämlich Chinon und die diesem nahestehenden Indophenole (o-Kresol-4-indophenol, o-Kresol-indo-2, 6-dichlorphenol, Phenol-4-indophenol, o-Chlorophenol-4-indophenol und 2,6-Dichlorphenol-indophenol), aber weder Indigo- noch Anthrachinonderivate (Indigotetrasulfonat u. Anthrachinon-β-sulfonat), noch Phenazine (Neutralrot, Phenosafranin), noch Oxazine (Nilblau), noch Thiazine (Methylenblau) (FRANKE u. LORENZ<sup>5</sup>). Gereinigte Präparate reduzieren ausserdem Toluylenblau, Thionin, Methylenblau, Pyocyanin, Safranin T und Cytochrom c (FRANKE u. DEFFNER<sup>6</sup>). Die Glucosedehydrase aus *A.o.* vermag Chinon und dieselben Indophenolfarbstoffe wie die sog. Glucoseoxydase zu reduzieren (mit Ausnahme von 1-Naphtol-2-sulfonat-indo-2,6-dichlorphenol), ausserdem einige Thiazinfarben (Thionin) und Indaminfarben (BINDSCHEDLER-Grün), dagegen nicht Oxazinfarben (Cresylblau, Nilblau), die Thiazinfarbe Methylenblau, die Indaminfarbe Toluylenblau, Cytochrom c und O<sub>2</sub> (OGURA<sup>3</sup>). Die Glucosedehydrase aus Säugetierleber vermag Methylenblau, Glutathion und Flavinenzym, aber nicht O<sub>2</sub> als Acceptor zu verwenden.

**Coenzym.** Die Glucosedehydrase aus *A.o.* und die sog. Glucoseoxydase sind nicht-dissoziierende Enzyme, die eine Codehydrase nicht abspalten. Die Glucosedehydrase aus Säugetierleber dissoziiert in eine Apodehydrase und eine Codehydrase. Als Codehydrase sind sowohl Cozymase (Codehydrase I, Diphosphopyridinnucleotid) wie Codehydrase II (Triphosphopyridinnucleotid) wirksam (DAS<sup>20</sup>).

\*) Abkürzungen: *A.n.* = *Aspergillus niger*. *A.o.* = *Aspergillus oryzae*.

**ph-Abhängigkeit.** Die sog. Glucoseoxydase hat ein ph-Optimum bei ungefähr 5,5 (MÜLLER <sup>1)</sup>)—5,0 (FRANKE u. LORENZ <sup>5)</sup>), die Glucosedehydrase aus *A.o.* bei 7,8 (OGURA <sup>3)</sup>) und die Glucosedehydrase aus Säugetierleber bei ph 6—8.

**2. Methodisches.** Enzympräparation. Die Glucosedehydrase aus Säugetierleber wurde nach HARRISON <sup>7)</sup> aus Ochsenleber hergestellt. Die Lebern wurden, wegen tierärztlicher Kontrolle, erst 24 Stunden nach Schlachtung eisgekühlt verarbeitet, lieferten aber Präparate, die in Aktivität denen von HARRISON gleich waren. Als Codehydrase wurde Cozymase aus Presshefe nach OHLMEYER <sup>8)</sup> verwendet.

Die beiden Pilze wurden in Blechpfannen (60 × 38 × 4 cm) mit Blechdeckeln kultiviert. Es genügt, die Blechpfannen und die Deckel durch Übergießen mit einer nicht zu konzentrierten Lösung von Paraffin in Aether zu sterilisieren. Beide Pilze wurden bei 31—32° kultiviert, dies ist jedenfalls für *A.n.* die physiologische Optimaltemp., obschon das schnellste Wachstum bei 35° stattfindet (JANISCH <sup>9)</sup>). 5 Blechpfannen mit je 2500 cm Substrat, infiziert mit Sporenaufschwemmung aus 5 konischen 300 cm Kolben, geben ungefähr 200 g in der Handpresse trockengepresstes Mycel, *A.n.* innerhalb 48 Stunden, *A.o.* innerhalb 72—96 Stunden. Vor der Trockenpressung liess man die Pilzdecken auf Salzlosung ohne Glucose 5—15 Stunden hungern. Nach Pressung in der Handpresse wurde *A.n.* nach MÜLLER (1936) und *A.o.* nach OGURA behandelt.

Die Dialyse geschah in Kollodiumschläuchen, nach SORENSSEN <sup>10)</sup> hergestellt. Nach 3-tägiger Dialyse bei +2° bis +5° gegen strömendes Wasser wird zentrifugiert und die Lösung durch Eintropfen in 96 % Alkohol: Aether 2:1 × 12 gefällt. Die sehr feinflockige Ausfällung wird auf BUCHNER-trichter mittels des dichten Filtrierpapiers SCHLEICHER u. SCHÜLL Nr. 575 abfiltriert, mit Aether gespült und über H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in vac. getrocknet. Die direkt aus Presssaft hergestellten Fällungen enthalten, wie auch FRANKE u. LORENZ <sup>5)</sup> hervorheben, irreversibel gefallte Proteine, die besten nach Dialyse gefällten Präparate sind dagegen in Wasser vollständig löslich.

Die Sauerstoffaufnahme wurde in dem von KROGH <sup>11)</sup> (vgl. MÜLLER <sup>1)</sup>, 1928) modifizierten BARCROFT-Apparat gemessen. Die Sauerstoffaufnahme wurde wie folgt angegeben

$$q_0, \text{ resp. } Q_0 = \frac{\text{mm}^3 \text{ O}_2 \text{ aufgenommen}}{\text{mg Enzympräparat} \times \text{Stunden}},$$

wo  $q_0$  die Sauerstoffaufnahme ohne Donator (Leeratmung) und  $Q_0$  die Sauerstoffaufnahme in Donatorlösung angibt. Die Sauerstoffaufnahme wurde immer 30 Minuten nach Mischung von Substrat und Enzymlösung gemessen.  $Q_0$  in Parallelversuchen variiert höchstens  $\pm 0,2$ .

Die THUNBERGMETHODIK wurde nach der von THUNBERG <sup>12)</sup> angegebenen Vorschriften verwendet. Für die Versuche mit *Aspergillus*-Enzym wurde 2,6-Dichlorphenol-indophenol (British Drug Houses)\*) verwendet. Jeden Versuchstag wurde frische Lösung in Pufferlösung verschiedener ph hergestellt und nach TILLMANS c.s. <sup>12)</sup> titriert.

Reinheit der Zuckerarten. d-Glucose I, rein wasserfrei, SCHERING. d-Mannose reinst, rechtsdrehend, SCHERING. d-Galactose „KAHLBAUM“.  $[\alpha]_D^{17} + 81,08^\circ$  ( $\alpha = + 9,47$ ,  $C = 5,840$ ,  $l = 2$ ) 24 Stunden nach Lösung in Wasser, berechnet nach der Formel:  $[\alpha]_D = + 83,883^\circ + 0,0785p + \div 0,209 + \text{solte } [\alpha]_D^{17} = + 80,79^\circ$  sein. Für die Reinheit des Präparats — keine Beimengung von Glucose und Mannose — sprechen auch das aus Tabelle VI ersichtliche geringe Wachstum von *A.n.* mit diesem Präparat. d-Xylose (rein, SCHERING-KAHLBAUM)  $[\alpha]_D^{20} + 19^\circ$  ( $\alpha = + 0,95$ ,  $C = 2,499$ ,  $l = 2$ ), 4 Stunden nach Lösung in Wasser, mit dem Gleichgewichtswert von HUDSON u. YANOVSKY <sup>13)</sup> übereinstimmend. Die Reinheit des Xylosepräparates geht überdies daraus hervor, dass Xylosezusatz zu Enzympräparat aus *A.n.* beinahe keine Mehrabsorption von O<sub>2</sub> hervorruft (Tabelle III).

**3. Die sog. Glucoseoxydase besteht aus zwei Enzymen, einer Glucoseoxyhydrase und einer anoxytropen Glucose-Dehydrase.** Während der Untersuchungen über die Donatorspezifität der sog. Glucoseoxydase ergaben sich mehrere experimentelle Befunde, die am besten durch die Hypothese zu erklären sind, dass die sog. Glucoseoxydase zwei Enzyme enthält, und zwar eine Glucoseoxyhydrase und eine anoxytrophe Glucose-Dehydrase. Diese Ergebnisse waren:

a) Es gibt kein konstantes Verhältnis zwischen  $Q_0$  und Reduktionszeit von Dichlorphenol, b) es wurde gefunden, dass das O<sub>2</sub>-reduzierende Enzyme thermostabiler ist als das Dichlorphenol-reduzierende, c) es gibt einen Unterschied im Verhältnis der sog. Glucoseoxydase gegenüber d-Xylose, wenn O<sub>2</sub> und wenn Dichlorphenol Acceptor ist, und d) eine zwar kleine Differenz in ph-Optimum, wenn O<sub>2</sub> und wenn Dichlorphenol Acceptor ist.

\*) Im folgenden als Dichlorphenol bezeichnet.



TABELLE I.

Vergleich der Reduktion von  $O_2$  und von 2,6-Dichlorphenol-indophenol mit Glucose als Donator durch gefällte + dialysierte Präparate von *A.n.* Versuche mit  $O_2$ : 5–12 mg Enzym + 2 ccm 0,25 mol. Glucose. Versuche mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol: In jedem THUNBERG-Rohr 0,2 ccm Enzym-lösung (2 oder 3 mg Enzym), 0,2 ccm n/900 2,6-Dichlorphenol-indophenol, 0,2 ccm Citrat- oder Phosphatpuffer und entweder 0,4 ccm Citrat- oder Phosphatpuffer oder 0,4 ccm 0,625 mol. Glucose in Citrat- oder Phosphatpuffer. Gesamtgehalt pro Rohr 1 ccm mit einer Donatorkonz. von 0,25 mol und einer Acceptorkonz. von n/4500. Temp. 25°.

	ph	mg Enzym	$Q_{O_2}$	Entfärbungszeit von 2,6-Dichlorphenol-indophenol (Minuten)	
				mit Glucose	ohne Glucose
1) <i>A.n.</i> 206 + 207 nicht dialys.	5,7	2	22,5	24	180
2) <i>A.n.</i> 206 + 207 dialys. . .	„	2	53,5	25	> 300
3) <i>A.n.</i> 207 redialys. . . . .	„	2	93,7	11	> 300
4) <i>A.n.</i> 208 nicht dialys. . .	„	2	6,8	92	> 300
	„	4		31	85
5) <i>A.n.</i> 208 dialys. I . . . . .	„	2	44,2	49	> 300
6) <i>A.n.</i> 209 unbehandelt . . .	„	2	21,8	55	ca. 250
7) <i>A.n.</i> 209 nach 3 Tage Stehen bei 0° . . . . .	„	2	19,2	41	> 300
8) <i>A.n.</i> 209 dialys. . . . .	„	2	50,9	28	> 300
	„	4		13	ca. 180
9) <i>A.n.</i> 202 dialys. . . . .	6,8	3	123,1	41	> 300
10) <i>A.n.</i> 206 + 207 dialys. . .	„	3	34,0	60	> 300
11) <i>A.n.</i> 208 dialys. . . . .	„	3	32,3	29	> 300

a) Das Verhältnis zwischen Reduktion von  $O_2$  und 2,6-Dichlorphenol-indophenol ist aus Tabelle I zu ersehen. Es geht hieraus hervor, dass starke Reduktion von  $O_2$ , grosser  $Q_{O_2}$ , nicht mit einem grossen Reduktionsvermögen gegenüber Dichlorphenol verbunden ist und umgekehrt. Z.B. hat das Präparat „*A.n.* 208 dialysiert“ ein  $Q_{O_2}$  von 44,2 und reduziert Dichlorphenol in 49 Minuten, während das Präparat „*A.n.* 206 + 207 nicht dialysiert“ einen  $Q_{O_2}$  von 22,5 hat, während dasselbe Präparat Dichlorphenol in 24 Minuten reduziert. Das Vermögen zur Reduktion von  $O_2$  und Dichlorphenol wurde durch Wiederauflösen, Stehenlassen bei 0° und wiederholte Fällung mit Alkohol: Aether nicht wesentlich verändert (Tabelle I und Präp. *A.n.* 209).

b) Die sog. Glucoseoxydase ist ziemlich thermostabil. Nach MÜLLER wird eine Lösung von Glucoseoxydase erst zur Hälfte destruiert nach Erwärmung in Wasserstoffatmosphäre auf 73° in 30 Minuten. Es wurde darum untersucht, ob die  $O_2$ -reduzierende und die Dichlorphenol-reduzierende Fähigkeit durch Erwärmen in Wasserstoff im selben Masse beeinträchtigt werden, und zwar wie folgt:

6 ccm 2 % Lösung in m/15 Citrat ph 5,6 von Alkohol: Aether gefälltes Präparat aus *A.n.* wird in einem THUNBERG-Rohr evacuirt, gleich nachher wird das Rohr mit reinem  $H_2$  gefüllt, wieder evacuirt, u.s.w. mindestens 5 Mal. Das wasserstoffgefüllte THUNBERG-Rohr mit der Enzymlösung wird dann 30 Minuten in Wasserbad bei 60° erwärmt, nachher schnell abgekühlt und die Enzymlösung entweder mit dem Proteinkoagel oder nach Abcentrifugieren des Proteinkoagels für Versuche verwendet.

Die Versuche sind in Tabelle II zusammengestellt. Hieraus geht hervor, dass die Fähigkeit zur Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol in Gegenwart von Glucose sehr stark beeinträchtigt ist, d.h. die Glucosedehydrase ist zum grössten Teil vernichtet. Dagegen ist die Fähigkeit zur Reduktion von  $O_2$  nur auf 94 % bis 67 % zurückgegangen. Es wäre sehr interessant, diese Erwärmungsversuche auch mit hochgereinigten Präparaten, wie denen von FRANKE u. DEFFNER <sup>6)</sup> auszuführen, Versuche, die beabsichtigt sind. Bis dahin scheint die natürlichste Erklärung der Erwärmungsversuche die zu sein, dass die Präparate der sog. Glucoseoxydase aus *A.n.* zwei Enzyme von verschiedener Thermotoleranz enthalten.

TABELLE II.

Für jeden Versuch: 120 mg Enzympräparat + 6 ccm m/15 Citrat-NaOH ph 5,6 wurde aufgerührt und 30 Min. in einem wasserstoffgefüllten THUNBERG-Rohr auf 60° erwärmt. Nach Abkühlung wurde die Enzymlösung entweder mit dem feinflockigen Koagulum oder nach Centrifugieren verwendet. Für die Versuche mit Sauerstoff als Acceptor wurde 2 ccm Enzymlösung mit 4,6 ccm Citrat-NaOH ph 5,6 verdünnt und 2 ccm mit 12,12 mg Enzym und 0,09 g Glucose, Donatorkonz. 0,25 mol, für Versuche in KROGH's Mikrorespirationsapparat verwendet. Für die Versuche mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol wurde die Enzymlösung nach Erwärmen entweder ohne oder nach Verdünnung verwendet. In jedem THUNBERG-Rohr: 0,2 ccm Enzymlösung (4 mg Enzym wenn unverdünnt, 2 mg Enzym wenn verdünnt) 0,2 ccm 2,6-Dichlorphenol-indophenol n/900, 0,2 ccm Citrat-NaOH ph 5,6 und entweder 0,4 ccm Citrat-NaOH ph 5,6 oder 0,4 ccm 0,625 mol. (Glucose in Citrat-NaOH ph 5,6. Gesamtgehalt pro Rohr 1 ccm mit einer Donatorkonz. von 0,25 mol. und einer Aczeptorkonz. von n/4500.

Die Versuche ohne Erwärmung wurden sonst in derselben Weise angestellt. Versuchstemp. 25°. ph nach Versuch gemessen 5,6—5,8.

		mg Enzym.	Q <sub>O</sub>	Entfärbungszeit von 2,6-Dichlorphenol-indophenol. (Minuten)	
				mit Glucose	ohne Glucose
A.n. 206 + 207 undialysiert. Nach Erwärmung nicht centrifugiert . .	Ohne Erwärm.	2	22,5	24	180
		4		12	80
	Nach „	4	21,1	110	135
A.n. 208 dialys. II. Nach Erwärmung nicht centrifugiert . . . . .	Ohne „	2	32,4	50	> 250
	Nach „	4	24,1	91	150
A.n. 209 undialysiert. Nach Erwärmung centrifugiert . . . . .	Ohne „	2	19,2	41	> 300
	Nach „	2	16,2	189	> 300
		4		89	196
A.n. 209 dialys. Nach Erwärmung centrifugiert .	Ohne „	2	50,9	28	> 300
		4		13	180
	Nach „	2	36,7	95	> 300
		4		43	> 300
		4		54	> 300
A.n. 210 undialysiert. Nach Erwärmung centrifugiert . . . . .	Ohne „	2	21,9	54	> 300
	Nach „	2	14,6	240	> 300
		4		119	145

TABELLE III.

Das Verhalten der sog. Glucoseoxydase gegenüber verschiedenen Donatoren und entweder O oder 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptoren. Die THUNBERG-Rohre waren wie für die Versuche in Tabelle I gefüllt, Gesamtgehalt pro Rohr 1 ccm mit einer Aczeptorkonz. von n/4500 und einem Enzymgehalt von 2 oder 3 mg Temp. 25°. In Versuch 1 und 2 war ph 6,8, in Versuch 3 ph 5,7.

1) A.n. 202, ph 6,8, nicht dialysiert.

Donator	Q <sub>O</sub> ÷ q <sub>O</sub> (q <sub>O</sub> = 2,3) in Donatorlösung von der Molarität:						
	1,0	0,50	0,25	0,1	0,05	0,025	0,0125
Glucose . . . . .	—	24,1	24,0	20,4	16,8	12,2	6,9
Galactose . . . . .	13,9	8,8	3,8	0,8			
Mannose . . . . .	4,0	2,3	(0,2)				

Das Verhältnis zwischen Q<sub>O</sub> ÷ q<sub>O</sub> in Glucose : Galactose : Mannose = 1 : 0,37 : 0,1 (Donatorkonz. 0,5 mol).

TABELLE III (Forts.).

2) A.n. 202, ph 6,8, dialysiert.

Donator	$Q_{O_2} \div q_{O_2}$ ( $q_{O_2} = 1,1$ ) in Donatorlösung von der Molarität:					
	0,50	0,25	0,1	0,05	0,025	0,0125
Glucose . . . . .	122,0	120,0	106,8	81,9	57,4	33,2
Galactose . . . . .	66,6	20,8				
Mannose . . . . .	15,0	5,1				
Xylose . . . . .	—	0				

Das Verhältnis zwischen  $Q_{O_2} \div q_{O_2}$  in Glucose: Galactose: Mannose = 1:0.17:0.04 (Donator-konz. 0,25 mol.).

Donator	Entfärbungszeit in Min. von 2,6-Dichlorphenol-indophenol, 3 mg Enzym A.n. 202, dialysiert, (Spontanentfärbungszeit 460 Min.) in Donatorlösung von der Molarität:	
	0,25 mol.	0,05 mol.
Glucose . . . . .	41'	56'
Galactose . . . . .	107'	136'
Mannose . . . . .	196'	173'
Xylose . . . . .	94'	129'
l-Arabinose . . . . .	460'	

8) A.n. 207, ph 5,7, redialysiert.

Donator	$Q_{O_2} \div q_{O_2}$ ( $q_{O_2} = 1,1$ ) in Donatorlösung von der Molarität:	
	0,25 mol.	0,0125 mol.
Glucose . . . . .	92,6	25,7
Galactose . . . . .	16,1	
Xylose . . . . .	2,8	

Donator	Entfärbungszeit von 2,6-Dichlorphenol-indophenol, 2 mg Enzym, Spontanentfärbungszeit > 300 Minuten, in Donatorlösung von der Molarität	
	0,25	0,0125
Glucose . . . . .	11'	31'
Galactose . . . . .	46'	
Xylose . . . . .	36'	

c) Das Verhältnis der sog. Glucoseoxydase gegenüber verschiedenen Donatoren und  $O_2$  oder 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptor. Wie Tabelle III zeigt ist Glucose der beste Donator für die sog. Glucoseoxydase. Mit  $O_2$  als Acceptor war das Verhältnis zwischen  $O_2$ -Absorption in 0,25 mol. Glucose, Galactose und Mannose wie 1:0.17:0.04. Dagegen war die  $O_2$ -Absorption in Gegenwart von d-Xylose, wie auch schon früher gefunden (MÜLLER 1929), Null oder beinahe Null. Um so merkwürdiger ist es, dass, wenn 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptor verwendet wird, die Donatoren sich nach der Reihenfolge Glucose > Xylose > Galactose > Mannose ordnen lassen. Nächste Glucose ist somit Xylose der

beste Donator. Bei der sehr kleinen Mehrabsorption von  $O_2$  in Gegenwart von Xylose und bei der Reinheit des Präparates ist es ausgeschlossen, dass dieser Donator-effekt aus Verunreinigung der Xylose mit Glucose herrührt. Entweder enthalten die Präparate der sog. Glucoseoxydase eine anoxytrophe Xylose-dehydrase, oder die sog. Glucoseoxydase vermag nur  $O_2$  als Acceptor zu verwenden, wenn Glucose, Galactose und Mannose Donatoren sind, nicht aber wenn Xylose Donator ist. Endlich ergibt sich als dritte Möglichkeit die, dass die sog. Glucoseoxydase zwei Enzyme enthält: Eine Glucoseoxyhydrase, die mit  $O_2$  als Acceptor Glucose > Galactose > Mannose dehydriert, aber nicht Xylose, und eine anoxytrophe Glucose-dehydrase, die Glucose > Xylose > Galactose > Mannose dehydriert. Wie die Versuche in Abschnitt a und b zeigen, lassen sich die verschiedenen Befunde am besten durch die letztere Hypothese erklären. Ob die von BERTRAND<sup>14)</sup> und von HAYASIDA<sup>15)</sup> gefundene Oxydation von *d*-Xylose zu Xylonsäure und *l*-Arabinose zu Arabonsäure durch *Acetobacter* und *Fusarium lini* durch eine „Pentose-Aerodehydrase“, wie HAYASIDA im Falle *Fusarium* meint, vermittelt wird oder durch eine Glucosedehydrase, bedarf erneuter Untersuchung. *l*-Arabinose ist nicht Donator für die anoxytrophe Glucose-dehydrase aus *A.n.*

d. ph-Abhängigkeit. Während die Glucoseoxyhydrase ein ph-Optimum zwischen 5—6 (MÜLLER<sup>1)</sup>) bis 5—5,5 (FRANKE u. LORENZ<sup>5)</sup>) aufzeigt, hat die anoxytrophe Glucose-dehydrase aus *A.n.* ein ph-Optimum zwischen 4 und 4,5 mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptor (Tabelle IV). Der Unterschied im ph-Optimum der Glucoseoxyhydrase und der Glucose-dehydrase ist indessen nur klein. Dagegen hat die Glucose-dehydrase von *A.o.* nach OGURA<sup>3)</sup> ein ph-Optimum bei 7,8.

TABELLE IV.

ph Abhängigkeit der Glucose-Anaerodehydrase *A.n.* In jedem THUNBERG-Rohr 0,2 ccm Enzym-lösung (2 mg Enzym *A.n.* 207 u. 3 mg Enzym *A.n.* 209), 0,2 ccm 2,6-Dichlorphenol-indophenol n/900 in dest. Wasser und entweder 0,6 ccm Pufferlösung (Citrat- oder Phosphatlösung nach SORESEN) oder 0,2 ccm Pufferlösung + 0,4 ccm 0,625 mol. Donatorlösung in Pufferlösung. Gesamtgehalt pro Rohr 1 ccm mit einer Donatorkonzentration von 0,25 mol. Temp. 25°. ph gleich nach Entfärbung gemessen.

		Entfärbungszeit in Minuten (Spontanentfärbungszeit > 300 Minuten)					
Präp. <i>A.n.</i> 207, dialysiert	ph:	3,55	4,25	5,80	6,88		
	Glucose	25	22	26	55		
	Xylose	144	52	79	180		
Präp. <i>A.n.</i> 209	ph:	3,87	4,16	4,48	4,73	4,90	5,38
	Glucose	21	17	19	20	22	23
	Xylose	78	59	58	62	66	70

4. Die anoxytrophe Glucose-dehydrase aus *Aspergillus oryzae*. Leider gelang es nicht, in Presssäften aus *A.o.* die von OGURA<sup>3)</sup> nachgewiesene Glucose-Anaerodehydrase zu finden, weder wenn der Pilz genau nach den Vorschriften OGURA's noch wenn er nach den Methoden, die für *A.n.* zur Anwendung kamen, behandelt wurde. Die Versuche in THUNBERG-Rohren wurden mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptor und Glucose als Donator ausgeführt, aber die Reduktionszeit mit und ohne Donator war genau dieselbe. Vielleicht ist der Unterschied zwischen diesen Befunden und denen von OGURA in Rassenunterschieden zu suchen.

5. Die Glucosedehydrase aus Säugetierleber. Wie die Versuche in Tabelle V zeigen, dehydriert Glucosedehydrase aus Ochsenleber mit Methylenblau als Acceptor *d*-Glucose > *d*-Xylose > *d*-Galactose, aber nicht *d*-Mannose und *l*-Arabinose, jedenfalls sind die letztgenannten beiden Kohlehydrate nur in so hohen Konz., und dann nur schlecht, als Donatoren wirksam, dass die Donatorwirkung auf Unreinheiten beruhen dürfte. Die Glucosedehydrase aus Säugetierleber dehydriert somit dieselben Kohlenhydrate wie die Glucosedehydrasen aus *A.n.* und *A.o.*, mit Ausnahme der Mannose, die wahrscheinlich für die letztgenannten beiden Dehydrasen Donator ist.

TABELLE V.

## Glucosedehydrase aus Ochsenleber.

Enzymlösung: 100 mg Trockenpräparat aus Ochsenleber nach HARRISON, 6 g Acetonleber entsprechend, in 10 ccm m/15 Phosphatpuffer ph 7,6 aufgerührt. In jedem THUNBERG-Rohr: 0,2 ccm Enzymlösung (2 mg Enzymtrockensubstanz, 120 mg Acetonleber entsprechend), 0,2 ccm Methylblau 1:5000, 0,2 ccm 0,1 % Cozymase in m/15 Phosphatpuffer ph 7,6 und entweder 0,4 ccm m/15 Phosphatpuffer ph 7,6 oder 0,4 ccm Donatorlösung in m/15 Phosphatpuffer ph 7,6, insgesamt 1 ccm in jedem THUNBERG-Rohr. ph nach Versuch 7,5. Temp. 25°. Entfärbungszeit ohne Donator, Spontanentfärbungszeit, 66—68 Min. In der Tabelle sind die Entfärbungszeiten auf Spontanentfärbungszeit = 100 Min. umgerechnet.

Gesamtkonz. des Donators	Entfärbungszeit in Min., wenn die Spontanentfärbungszeit gleich 100 Min.				
	d-Glucose	d-Galactose	d-Mannose	d-Xylose	l-Arabinose
0,0125 m . . . . .	26	—	—	37	97
0,025 m . . . . .	20	62	—	29	97
0,050 m . . . . .	18	50	—	26	—
0,25 m . . . . .	15	27	90	24	91
0,50 m . . . . .	—	—	83	—	—

6. Die Hexosen als C-Quelle für *A.n.* HORR und STEINBERG<sup>16, 17)</sup> haben gefunden, dass die Trockensubstanzproduktion von *A.n.* mit Hexosen als C-Quelle am grössten ist mit Glucose und Mannose und sehr klein mit Galactose. Da indessen das Oxydationsvermögen der sog. Glucoseoxydase den drei Hexosen gegenüber sich ungefähr wie Glucose 1: Galactose 0,17: Mannose 0,04 verhält, wäre es von Interesse zu sehen, ob auch die Rasse von *A.n.*, die zu den Enzympräparationen verwendet wurde, mit Mannose besser als mit Galactose gedeiht.

TABELLE VI.

*Aspergillus niger*. Wachstum auf verschiedenen Zuckerarten. Temp. 31°. Kultiviert auf 100 g Substrat in 300 cc ERLLENMEYERKolben, jeder Kolben mit 1 ccm einer Konidienaufschwemmung geimpft. Das Substrat enthielt in 1000 ccm 2 g  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 g KCl, 0,01 g  $\text{FeCl}_3$ , 0,5 g Citronensäure und 1 ccm HOAGLANDS A—Z-Lösung. Vor den Analysen wurden die Kolben auf Anfangsgewicht mit dest. Wasser versetzt. Zuckerbestimmungen nach BERTRAND.

		d-Galactose		d-Mannose		d-Glucose	
g Zucker pro 100 g . . . .	am Anfang . . . . .	1,96	3,97	2,05	3,97	1,94	3,86
	nach Wachstum in 70 St.	1,87	3,89	1,16	2,92	0,71	2,28
	" " „120 „	1,77	3,70	0,37	1,65	0,19	1,15
	" " „170 „	1,66	3,59	0,07	0,74	0,006	0,39
ph (am Anfang 4,5) . . .	nach Wachstum in 70 St.	5,4	6,1	6,3	4,5	5,6	3,9
	" " „120 „	6,4	6,6	2,7	2,4	3,1	3,1
	" " „170 „	6,7	6,9	3,0	2,4	3,8	3,1
ccm nNaOH pro 100 g zur Neutralisation. (am Anfang 0,53 ccm) . . . .	nach Wachstum in 70 St.	0,27	0,16	0,12	0,60	0,23	1,11
	" " „120 „	0,13	0,12	0,75	1,76	0,55	1,55
	" " „170 „	0,08	0,05	0,37	1,21	0,18	0,95
g Pilz-Trockensubstanz .	nach Wachstum in 70 St.	0,065	0,120	0,449	0,478	0,585	0,625
	" " „120 „	0,070	0,101	0,816	0,960	0,854	0,881
	" " „170 „	0,115	0,170	0,797	1,068	0,835	1,054
g Pilz-Trockensubstanz .	nach Wachstum in 70 St.	—	—	0,50	0,46	0,48	0,40
g Zucker verbraucht	" " „120 „	0,37	0,37	0,49	0,41	0,49	0,33

Die Versuche in Tabelle VI zeigen Übereinstimmung mit den Befunden von HÖRR und STEINBERG über den Nährwert der drei Hexosen, d.h. das Oxydationsvermögen der sog. Glucoseoxydase den drei Hexosen gegenüber kann nicht allein für den Nährwert bestimmend sein. Von Interesse ist auch die grosse Säureproduktion auf Mannose. Leider ist die Säure noch nicht isoliert worden. ANGELETTI und CERUTTI<sup>18)</sup> haben eine Produktion von Mannonsäure auf Mannose durch *Penicillium purpurogenum* gefunden, aber in den Versuchen mit Enzympräparaten von *A.n.* wurde Mannose erst in 0,25—0,5 mol. Lösung merkbar oxydiert, während in den Kulturversuchen die Säureproduktion auf 0,11—0,22 mol. Mannose stattfand.

### Zusammenfassung.

1) Die sog. Glucoseoxydase aus *A.n.* dehydriert mit O<sub>2</sub> als Acceptor Glucose > Galactose > Mannose, aber nicht Xylose, mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptor dagegen Glucose > Xylose > Galactose > Mannose.

2) Durch Erwärmung (60° in 30 Minuten) einer Lösung der sog. Glucoseoxydase in Wasserstoff wird die Fähigkeit zur Reduktion von O<sub>2</sub> in Gegenwart von Glucose auf 94—67 % herabgesetzt, aber die Fähigkeit zur Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol wurde bei weitem mehr beeinträchtigt.

3) Aus dem Verhalten den verschiedenen Donatoren gegenüber mit entweder O<sub>2</sub> oder 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptor und aus dem Verhalten gegenüber Erwärmung wurde geschlossen, dass die Präparate der sog. Glucoseoxydase zwei Enzyme enthalten, eine Glucose-oxhydrase, die mit O<sub>2</sub> als Acceptor Glucose > Galactose > Mannose, aber nicht Xylose, dehydriert und eine anoxytrope Glucose-dehydrase, die mit 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptor Glucose > Xylose > Galactose > Mannose dehydriert.

4) Die Glucosedehydrase aus Ochsenleber dehydriert mit Methylenblau als Acceptor Glucose > Xylose > Galactose, aber nicht Mannose.

5) Die Glucosedehydrase, die von OGURA in *A.o.* gefunden wurde, liess sich in der hier vorhandenen Rasse nicht nachweisen.

6) Die Trockensubstanzproduktion von *A.n.* ist auf Glucose und Mannose beinahe dieselbe und weit grösser als auf Galactose. Der Nährwert der Hexosen wird somit nicht allein durch das Oxydationsvermögen der Glucose-oxhydrase und Glucose-dehydrase bestimmt.

- 1) D. Müller, Bioch. Zs. **199**, 136 (1928); **205**, 111 (1929); *Ergebn. d. Enzymforsch.* **5**, 259 (1936). —
- 2) D. Harrison, Biochem. J. **25**, 1016 (1931); **27**, 382 (1933). — 3) Y. Ogura, Acta Phytochim. **11**, 127 (1939). — 4) W. Franke, B. Banerjee, Bioch. Zs. **305**, 57 (1940). — 5) W. Franke, F. Lorenz, Ann. Chem. (LIEBIG) **532**, 1 (1937). — 6) W. Franke, M. Deffner, Ann. Chem. (LIEBIG) **541**, 117 (1939). —
- 7) D. Harrison, *Ergebn. Enzymforsch.* **4**, 297 (1935). — 8) P. Ohlmeyer, Bioch. Zs. **287**, 212 (1936). —
- 9) E. Janisch, Cbl. Bakt. (II) **101**, 120, (1939). — 10) S. Sørensen, Meddel. Carlsberg (København) **12**, 28 (1915). — 11) A. Krogh, in Abderhaldens Hdb. d. biochem. Arbeitsmethod. **8**, 51 (1915). — 12) J. Tillmans, P. Hirsch, W. Hirsch, Zs. Unters. Lebensmittel **63**, 1 (1932). — 13) C. Hudson, E. Yanovsky, J. Am. Chem. Soc. **39**, 1013 (1917). — 14) G. Bertrand, Ann. de chim. phys. 8. Ser. **3**, 181 (1904). —
- 15) A. Hayasida, Bioch. Zs. **298**, 169 (1939). — 16) W. Hörr, Plant Physiol. **11**, 81 (1936). — 17) R. Steinberg, Proc. Intern. Congr. Microbiol. (1939). — 18) A. Angelletti, C. Cerutti, Ann. di chim. applic. **20**, 424 (1930). — 19) T. Thunberg in C. Oppenheimer, Die Fermente, 5. Aufl., **3**, 1118 (1929). —
- 20) N. Das, Zs. physiol. Chem. **238**, 269 (1936).

# Sur une relation entre l'inhibition de la glycolyse et l'action vésicante

PAR

Z. M. BACQ

(Lab. de Physiol. animale de l'Univ. de Liège)

Avec 1 figure.

(20.I.41.)

Des recherches entreprises dans le but d'élucider le mode d'action des vésicants, suffocants et lacrymogènes utilisés comme agents thérapeutiques ou comme toxiques de guerre, nous ont conduit, mes collaborateurs et moi, à découvrir inopinément une relation étroite entre l'action antiglycolytique et les effets tant locaux que généraux de ces corps.

Le présent article est destiné à exposer aussi clairement que possible les étapes de cette découverte et à montrer l'intérêt que peuvent présenter ces faits nouveaux, tant en biochimie qu'en pharmacodynamie et en pathologie.

**I. Les vésicants, suffocants et lacrymogènes agissent sur le muscle strié de Grenouille comme les acides acétiques monohalogénés (1, 2).** Une observation fortuite, en novembre 1939, me fit entrevoir cette curieuse analogie d'action. Par la suite, avec mes collaborateurs GOFFART et ANGENOT, j'ai pu établir la généralité du fait grâce à une nombreuse série d'expériences. Je me contenterai de citer les plus suggestives d'entr'elles.

L'ypérite (sulfure de dichloréthyle) possède deux dérivés oxydés dont l'un, la sulfone (où le soufre est hexavalent), a conservé de notables propriétés vésicantes, alors que l'autre, le sulfoxyde, où le soufre est tétravalent, est inactif sur la peau et très peu toxique. L'ypérite et sa sulfone font apparaître, comme le monobromo- ou le monoiodoacétate, un tracé de contracture et d'inexcitabilité après travail, tracé caractéristique et spécifique que nous avons proposé d'appeler „*effet LUNDGAARD* 2a)” du nom de celui qui fut le premier à le décrire. Le sulfoxyde de l'ypérite, par contre, est sans action sur le muscle de Grenouille. Les tracés obtenus avec des corps comme l'isosulfocyanate d'allyle (essence de moutarde), la chloracétophénone et le monoiodoacétate sont superposables; le physiologiste le plus averti les confond.

Tous les vésicants, suffocants et lacrymogènes ont, sans exception, donné un effet LUNDGAARD plus ou moins typique et plus ou moins marqué selon l'intensité de leur action irritante locale.

Notre expérience porte sur la série suivante: ypérite, sulfone de l'ypérite, sulfocyanate d'allyle, hydrate de chloral, essence de térébenthine, poivre de Cayenne, cantharide, chloracétophénone, chloropicrine, bromopicrine, bromure de benzyle. Au contraire, des corps très voisins de structure, mais inactifs comme vésicants ou lacrymogènes, ne donnent pas l'effet LUNDGAARD. Tels sont par exemple le thiodiglycol (résultat de l'hydrolyse de l'ypérite), le sulfoxyde de l'ypérite, le m- et p-bromotoluène, l'hexachloréthane etc. Le dichloréthane donne un léger effet LUNDGAARD; nous reviendrons sur ce point.

**II. Dans la série des acides acétiques monohalogénés, l'intensité de l'action vésicante est parallèle à celle de l'action antiglycolytique et de l'intensité des effets LUNDGAARD qu'ils provoquent (1, 2).** Nous avons étudié les temps et les concentrations nécessaires pour que l'effet LUNDGAARD apparaisse (voir fig. 1). Si l'action du dérivé iodé est supposée égale à 1, celle du dérivé bromé est à peu près  $\frac{1}{2}$ , celle des dérivés chlorés et fluorés de  $\frac{1}{400}$  à  $\frac{1}{600}$ .

Les traités de chimie signalent l'action vésicante rapide et profonde de l'acide monobrom-

acétique; un accident survenu à l'un d'entre nous a confirmé le fait. Sur nous-mêmes, nous avons observé l'action vésicante extraordinairement puissante de l'acide monoiodoacétique appliqué en solution concentrée pendant 5 minutes seulement sur la peau de l'avant bras. Les acides monochloro- et monofluoracétiques ont une action beaucoup plus faible, mais cependant nette.

Si l'on compare ces effets à ceux de l'ypérite, on voit: 1°. que la sensation de cuisson suivie de rougeur est rapide (30 secondes) avec les acides acétiques monohalogénés, que la lésion caractéristique — les phlyctènes confluent en bulle — apparaît dès la deuxième heure, alors que, dans le cas de l'ypérite, la rougeur est tardive et les phlyctènes n'apparaissent que vers la dixième heure; 2°. que l'évolution des lésions produites par l'acide monoiodoacétique est identique à celle des brûlures par l'ypérite: bulle, escharre cartonné, élimination de l'escharre, épidermisation lente. De plus, fait typique des vieilles lésions par l'ypérite, il reste, à l'endroit où fut appliqué l'acide acétique monohalogéné, une tache pigmentée persistante. Pour citer un fait précis, je conserve sur l'avant bras une tache pigmentée pour avoir, il y a huit mois, expérimenté les effets de l'acide fluoracétique.

La même série  $I > Br > Cl$  se retrouve quand on considère les effets des esters éthyliques de ces acides acétiques monohalogénés. Le monochloroacétate d'éthyle est très peu lacrymogène, alors que le monoiodoacétate d'éthyle est bien connu comme un des lacrymogènes les plus puissants, à peu près deux fois plus actif que le dérivé bromé.

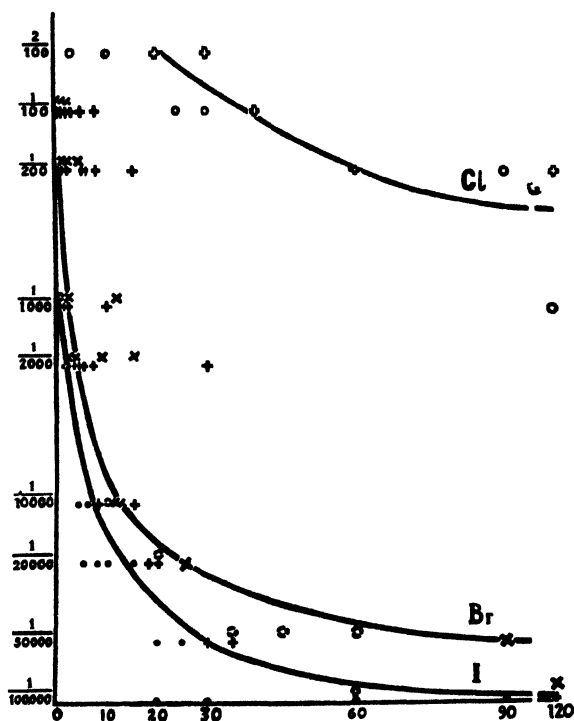


Fig. 1. Action des trois acides acétiques monohalogénés (neutralisés) sur le rectus de Grenouille excitée au potassium. En abscisses, durée de l'intoxication; en ordonnées, concentration en échelle logarithmique. A gauche de chaque courbe, résultats négatifs. A droite, résultats positifs. La courbe passe donc par le seuil de l'effet LUNDGAARD. Points noirs et croix pleines: monoiodoacétate, I. Cercles interrompus et croix de St. André: monobromoacétate, Br. Cercles et croix blanches: monochloroacétate, Cl.

**III. Les vésicants, lacrymogènes et suffocants sont des inhibiteurs de la fermentation lactique (2, 3).** Les vésicants et lacrymogènes puissants (chloracétophénone, chloropicrine, isosulfocyanate d'allyle etc.) inhibent cette fermentation à concentration faible; les vésicants faibles, dont l'hydrate de chloral est le type, n'inhibent qu'à concentration forte.

La technique que nous avons utilisée au mieux de nos moyens matériels était la suivante: Deux lots de 3 g environ de muscles des pattes postérieures d'une même grenouille (*R. temporaria*) sont finement broyés au mortier avec un peu de sable lavé et quelques cc d'eau. On transvase dans des ballons jaugés de 200 cc contenant 20 cc de tampon de phosphates M/5 à pH 7,6; on complète au volume avec une solution de glucose à 1%. Dans l'un des ballons, on ajoute le vésicant à la concentration voulue. Si ce vésicant est peu soluble, il est préalablement dissout dans la solution de glucose. L'autre ballon où la fermentation peut se poursuivre normalement, sert de témoin. On met à l'étuve à 30°. Aucun effort ne fut fait en vue de conserver ces solutions à l'abri des infections, étant donné que les acides acétiques monohalogénés bloquent toute glycolyse, qu'elle soit musculaire, bactérienne,



ou qu'elle ait son origine dans les ferments des levures. Nous avons vérifié ce fait avec notre technique. Les dosages d'acide lactique sont effectués en double sur des prises de 50 cc faites avant la fermentation, après 24 heures et après 48 heures.

On précipite les protéines au nitrate mercurique; on neutralise et on filtre. On procède ensuite à la défécation des hydrates de carbone par la chaux et le sulfate de cuivre.

Le dosage de l'acide lactique se fait par la méthode de FÜRTH-CLAUSEN modifiée par FRIEDMANN et GRAESER 4): oxydation lente à chaud au moyen de bioxyde de manganèse colloïdal, en présence d'un catalyseur constitué par un mélange de  $\text{MnSO}_4$  et  $\text{PO}_4\text{H}_3$ ; absorption de l'aldéhyde acétique formée, par une solution de bisulfite de soude, oxydation de l'excès de bisulfite par l'iode et finalement dosage par iodométrie du bisulfite libéré de sa combinaison aldéhydique. Nous avons vérifié la méthode sur des solutions pures d'acide lactique de titres connus. Les résultats concordent à 1% près sur des quantités de l'ordre du mgr.

Avec la technique décrite ci-dessus, on arrive à obtenir dans les témoins une concentration de 40 à 110 mgr % d'acide lactique après 48 heures.

Le Tableau I résume nos résultats; nous avons calculé l'inhibition en % par rapport aux témoins; le lecteur trouvera nos chiffres détaillés dans le mémoire de BACQ, GOFFART et ANGENOT 2).

TABLEAU I.

Inhibition d'une fermentation lactique par divers vésicants et toxiques de guerre.

Substance	Concentration %	% Inhibition après 24 h.	% Inhibition après 48 h.	Observations
Sulfone de l'ypérite	0.05 0.001	100 75	100 16	Vésicant
Sulfoxyde de l'ypérite	0.05	0	0	Non vésicant
Hydrate de chloral	0.5 0.05	100 0	100 0	Vésicant très faible
Chloropicrine	0.05 0.01 0.005	100 100 80	100 100 40	Lacrymogène et suffocant
Chloracéto-phénone	0.025 0.005 0.0025	100 75 90	100 82 0	Lacrymogène et très irritant à la peau
Isosulfocyanate d'allyle	0.02 0.01 0.005 0.0025	100 100 100 0	100 100 100 0	Vésicant
Bromure de benzyle	3/4 sat. sat.	46 100	0 100	Lacrymogène
Thiodiglycol	0.5	0	0	Non toxique
Dichloréthane symétrique	sat.	100	56	Effet LUNDGAARD + Nécosant en injection dans la peau

Nos essais faits en vue de démontrer une éventuelle inhibition de la glycolyse par l'essence de térébenthine et une macération de poudre de cantharide ont échoué; mais diverses causes d'erreur que nous n'avons pas eu le loisir d'élucider rendent ces essais sans valeur.

La technique décrite ci-dessus n'est pas irréprochable. Nous opérons en milieu pratiquement, mais non strictement anaérobie; d'autre part, nous avons fréquemment observé qu'à la suite de ces longues fermentations, le tampon était forcé, le ph devenant nettement acide. De plus, nous n'avons pris aucune précaution d'asepsie. C'est pourquoi J. THOMAS (observations inédites), à notre demande,

a refait une série d'expérience de courte durée (une heure) en prenant comme substrat du glycogène, comme source d'enzyme du muscle de pigeon broyé, et en travaillant en milieu fortement tamponné à 40° en condition anaérobie stricte. Il a pu observer dans ces conditions une inhibition totale par l'ypérite et une inhibition moins marquée, mais cependant très nette, par la sulfone de l'ypérite.

**IV. Les vésicants, suffocants et lacrymogènes attaquent les groupes sulfhydriles libres des protéines et du glutathion.** On sait par les travaux de nombreux auteurs (voir notamment DICKENS<sup>6</sup>) et RAPKINE<sup>6</sup>) que les acides acétiques monohalogénés font disparaître les groupes sulfhydriles libres des protéines, du glutathion et de la cystéine sans que le mécanisme de cette action et la nature exacte des produits qui en résultent aient été pleinement élucidés.

Deux techniques ont été mises en jeu pour voir si, à ce point de vue également, l'action des toxiques de guerre et autres vésicants est identique à celle des acides acétiques monohalogénés: une technique histochimique et une technique chimique. A vrai dire, l'idée de l'oxydation des groupes —SH avec passage à la forme disulfure S—S a déjà été mise en avant par RAY, GUHA et DAS<sup>7</sup>) et par NEKRASSOW et MELNITOW<sup>8</sup>) en ce qui concerne la chloropierine. WALKER<sup>9</sup>) déclare que l'isosulfocyanate d'allyle fait disparaître la réaction colorée des —SH, mais sans formation de S—S; il se ferait un composé d'addition du type R—S—R'. Ces auteurs, hâtons nous de le dire, ne songent pas à faire de ce processus une loi générale de la vésication ni ne prévoient le rôle que joue cette oxydation dans le métabolisme de la cellule.

a) Technique histochimique, mise en oeuvre par GOFFART \*).

Les essais de GOFFART ont été faits sur la peau du Cobaye. On colore les coupes à congélation de 60 à 90  $\mu$  par le nitroprussiate de sodium à 7 % pendant 3 minutes, après mordantage à l'acétate de zinc pendant 10 secondes, selon la technique mise au point par GIROUD et BULLIARD. La basale et la couche spinocellulaire de l'épithélium ainsi que la gaine épithéliale externe du poil se colorent en rose; le bulbe pileux prend une teinte rouge-violet et le muscle peaucier un beau ton rouge vif. Les teintes sont plus nettes si le fragment de peau est prélevé dans une zone non pigmentée. Il s'agit de groupes —SH liés aux protéines et non solubles dans l'eau. Ils persistent au moins 72 heures après la mort. Cinq à dix coupes sont étalées sur deux lames; l'une est conservée dans l'eau comme témoin; l'autre lame est recouverte du toxique. Les comparaisons microscopiques au faible grossissement se font presque en même temps. Toutes les expériences sont faites à la température du laboratoire (16 à 19°).

L'ypérite, l'acide monoiodoacétique, l'isosulfocyanate d'allyle, la chloropierine et la chloracétophénone font disparaître des coupes la coloration spécifique des groupes —SH. La chloropierine est la plus active: les coupes couvertes d'eau en atmosphère saturée de chloropierine perdent toute coloration en 15 minutes; „*a fortiori*” si la chloropierine pure recouvre toute la préparation. La chloracétophénone (en solution à 0,1 %) fait disparaître les groupes —SH de l'épiderme et du poil après un contact de 30 à 60 minutes; le muscle peaucier reste bien coloré. L'essence de moutarde pure et en solution à 0,1 % exerce une action semblable à celle de la chloracétophénone. L'acide monoiodoacétique en solution concentrée oxyde les groupes sulfhydriles de l'épiderme en respectant le poil et le muscle peaucier si la durée d'action n'excède pas 30 minutes; en solution à 0,1 % la disparition des groupes —SH n'est totale qu'après 120 à 180 minutes.

L'ypérite agit plus lentement, ce qui est conforme aux observations cliniques et physiologiques. Déposée pure sur les coupes, elle ne fait disparaître les groupes —SH qu'à la 80ème minute environ dans l'épiderme et les poils, qu'à la 5ème heure dans le peaucier.

GOFFART a également observé que si on prélève un fragment de peau après application du toxique „*in vivo*”, sur l'épiderme, le même phénomène se reproduit. La conjonctive bulbaire et palpébrale est très riche en groupes sulfhydriles qui ne sont protégés que par une mince pellicule exempte de ces —SH. Ce fait permet d'expliquer, selon notre théorie, l'extrême agressivité de ces toxiques pour l'oeil. La muqueuse bronchique également contient des groupes —SH colorables au nitroprussiate.

b) Technique chimique: J. THOMAS (observations inédites) a dosé les groupes —SH libres d'une solution de glutathion en présence d'ypérite, de sa sulfone et de son sulfoxyde. Ces

\*) Acta biologica belgica, sous presse.



La même série  $I > Br > Cl$  se retrouve, quand on étudie le pouvoir lacrymogène des halo-gèneacétates d'éthyle. Le nombre de faits que nos observations permettent de concentrer sur un seul point apparaît comme la meilleure confirmation de la théorie cohérente qu'il nous permet de formuler. Cette théorie, à laquelle nous donnons le caractère très général que le cadre de nos expériences autorise, nous sert d'hypothèse de travail. Nous avons déjà vérifié plus d'une fois que, à ce titre, elle se révèle féconde. Nous la formulerons comme suit:

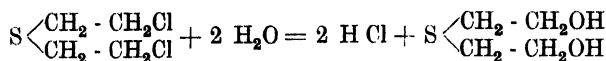
Un corps vésicant, après avoir réussi à pénétrer dans la peau grâce à sa solubilité dans les graisses, bloque les groupes  $-SH$  des cellules de l'épiderme et des poils et inhibe certaines réactions enzymatiques d'importance vitale (comme la glycolyse). Le métabolisme de ces cellules est ainsi profondément troublé; la perméabilité des membranes et des capillaires s'altère; une abondante exsudation de lymphes vient progressivement décoller la couche superficielle de la peau. Si l'intoxication est profonde, si la restauration des fonctions enzymatiques ne peut s'effectuer notamment par l'apport de groupes  $-SH$  sanguins, la cellule doit inévitablement mourir, subir une nécrose aseptique. Les cellules moins touchées, à la périphérie de la lésion, réussissent à surmonter les conséquences d'une intoxication légère. Ainsi se fait la délimitation de l'escarre cartonnée aseptique. L'évolution ultérieure de la plaie est banale; on voit se dérouler après élimination de l'escarre, les diverses phases de la cicatrisation. Bien entendu, le mécanisme de la formation de l'œdème, de l'exsudation de la lymphe, sort du cadre des faits envisagés dans ce travail. Nous nous contenterons à ce propos de signaler une observation de RÜHL et THADDEA<sup>10</sup>); ces auteurs ont vu se développer un œdème du poumon après injection d'acide monoiodoacétique dans une circulation cœur-poumons de Chien. A ce point de vue aussi, analogie entre cet acide et les toxiques de guerre.

Evidemment, notre théorie — hypothèse de travail — ne précise pas le mécanisme de l'œdème et de la nécrose. Nous rappellerons que le mécanisme de la contraction du muscle strié stimulé après intoxication au monoiodoacétate, le déterminisme de l'effet LUNDSGAARD lui-même, nous est inconnu. Tout ce qu'on sait, c'est que l'acide lactique n'est pas en cause.

Examinons maintenant les objections que soulève une telle théorie. Certaines m'ont été formulées par mes collaborateurs au cours du travail expérimental, d'autres par mes collègues au cours de la discussion des communications préliminaires, d'autres encore surgissent de la comparaison entre nos observations et les idées répandues dans la littérature abondante en matière de toxiques de guerre.

**1ère objection:** A quoi bon une théorie nouvelle, alors qu'il existe une théorie qui rallie la plupart des suffrages et qui est enseignée partout? A vrai dire, la théorie de l'hydrolyse endoplasmique est d'une insuffisance notoire et il est regrettable qu'elle ait servi de base pendant plus de 25 ans aux tentatives thérapeutiques et aux systèmes de protection individuelle ou collective.

Cette théorie veut que l'ypérite, pénétrant dans les tissus y subisse, comme en solution aqueuse, une hydrolyse rapide donnant naissance à de l'acide chlorhydrique et du thiodyglycol. Ce dernier corps étant dépourvu de toute action vésicante, l' $HCl$  libéré serait seul responsable de l'effet toxique de l'ypérite.



Cette théorie n'est guère acceptée qu'avec réticence par certains auteurs (HEDERER et ISTIN<sup>11</sup>) p. 239; d'autres (DAUTREBAND<sup>12</sup>), p. 164) la mentionnent à l'exclusion de toute autre interprétation et ne citent que les faits en apparence favorables à cette théorie.

Il n'est pas douteux que, même en négligeant notre travail, les mérites de cette théorie soient faibles par rapport à ses imperfections. L'acide chlorhydrique n'est pas un vésicant, mais un caustique. De plus, le sulfure de dichloréthyle est un poison bien plus redoutable que l' $HCl$ . Si on dépose sur l'avant bras d'un sujet sensible 0,3 mgr d'ypérite pure, la peau rougit au bout de quatre heures, les phlyctènes apparaissent à la dixième heure et la brûlure met plus d'un mois à guérir. La vésication ne peut pas être attribuée à la faible quantité d'acide chlorhydrique libérable (0,15 mgr) que les tampons humoraux et cellulaires neutraliseraient facilement. L'idée

que l' HCl libéré puisse être plus actif parce que se présentant à l'état „*naissant*” est insoutenable du point de vue physico-chimique.

La théorie de l'hydrolyse endoplasmique n'explique pas l'action vésicante de corps parfaitement stables comme l'isosulfocyanate d'allyle par exemple; elle est en contradiction avec le fait que le sulfure de dichlorméthyle ( $S < \begin{smallmatrix} CH_2Cl \\ CH_2Cl \end{smallmatrix}$ ) n'est pas vésicant bien qu'il s'hydrolyse cinq fois plus vite que l'ypérite (PETERS et WALKER<sup>13</sup>). Les dérivés cyanés et sulfocyanés du sulfure d'éthyle sont vésicants bien que les acides qu'ils pourraient libérer (HCN ou HCNS) soient des acides faibles non caustiques (DAVIES<sup>14</sup>), NEKRASSOW<sup>15</sup>), STEINKOPF<sup>16</sup>)). Déclarer avec FLURY (dans MUNTSCHE<sup>17</sup>) p. 62) que l'ypérite est un poison cellulaire nécrosant ne nous apprend rien sur le mécanisme d'action de cette substance. On trouvera encore dans la littérature d'autres théories moins répandues qui, toutes, paraissent insuffisantes bien que plus proches de notre conception.

À la vérité, certains auteurs dont la compétence est universellement admise, n'ont pas caché le sentiment d'ignorance qu'ils ressentaient „*Denn es gibt Tage und Wochen wo mir die Wirkung des Dichloraethylsulfids so rätselhaft ist, dass ich mir vorkomme, als wenn ich da stände, wo ich stand, als ich noch nichts von diesem Stoffe wusste.*” (BÜSCHER<sup>18</sup>) p. 11).

Notre étude vérifie certaines prédictions que l'on trouve dans la littérature et en précise singulièrement la portée: „*Neuere Untersuchungen über Zellgifte haben ergeben, dass diese in der Hauptsache Fermentgifte sind und man wird kaum fehlgehen, wenn man die Wirkung auch des Gelbkreuzstoffes \*) in den Zellen als eine Schädigung lebenswichtiger fermentativer Prozesse anspricht.*” (MUNTSCHE<sup>17</sup>) p. 63).

**2ème objection.** S'ils agissent fondamentalement de la même façon, pourquoi certains de ces toxiques de guerre sont-ils vésicants, d'autres lacrymogènes, d'autres encore suffocants?

a) Remarquons que tous les vésicants sont, à concentration de vapeur suffisante, des lacrymogènes et qu'ils produisent des lésions oculaires graves. Le fait est indéniable en ce qui concerne l'ypérite et l'essence de moutarde.

b) Des lacrymogènes typiques sont vésicants, par exemple l'iodoacétate d'éthyle, à condition qu'on expose la peau pendant un temps suffisamment long à des vapeurs concentrées. Le bromure de benzyle est irritant à la peau et si on en injecte 0,2 cc dans le derme d'un Chien, on détermine la formation d'une énorme escharre lente à s'éliminer et à guérir, escharre semblable à celle que produit dans les mêmes conditions un vésicant vrai. Le bromure de benzyle est oedématisant, escharriant et nécrosant comme l'ypérite ou l'acide iodoacétique si on le fait pénétrer artificiellement dans la peau. Ajoutons, à titre de contrôle, que l'injection d'une quantité égale de p-bromotoluène non lacrymogène n'est suivie d'aucune lésion.

c) Les suffocants comme la chloropicrine et la bromopicrine sont aussi de puissants lacrymogènes. En réalité, la classification des toxiques de guerre est d'ordre plus clinique et militaire que pharmacologique. Il n'y a pas de démarcation nette entre les trois classes de toxiques, les vésicants, les suffocants et les lacrymogènes.

d) L'attaque des groupes —SH liés aux protéines ne s'effectue pas avec la même intensité et dans le même ordre si on considère les divers toxiques et les diverses localisations de ces groupes —SH. Par exemple, la coloration au nitroprussiate révèle que sous l'influence de l'isosulfocyanate d'allyle et de la chloracétophénone, les groupes —SH disparaissent d'abord dans le bulbe pileux, puis dans la basale de l'épiderme et finalement dans le muscle peaucier. Par contre, le monoiodoacétate s'attaque en premier lieu aux groupes —SH de l'épiderme et en dernier lieu seulement à ceux du bulbe pileux.

e) Outre leurs effets sur la glycolyse et les groupes —SH, certains toxiques de guerre possèdent des actions physiologiques toutes particulières susceptibles de modifier quelque peu le tableau clinique. Par exemple, la chloropicrine est, avec la bromopicrine, le seul toxique de guerre qui, dans notre étude sur le muscle strié de Grenouille (BACQ, GOFFART et ANGENOT<sup>1</sup>) se soit montré doué de propriétés véraltrinaires. À l'inverse des autres toxiques, il sensibilise le

\*) *Gelbkreuz* est synonyme d'ypérite.

muscle aux ions  $K^+$  (voir BACQ<sup>19</sup>). De plus, le ganglion et la fibre sympathiques du Chat ainsi que le nerf isolé de Grenouille, sous l'influence de la chloropierine, répondent de façon répétitive (par une volée de 3 à 40 influx) à un stimulus unique, et, après un certain nombre de stimuli, le ganglion sympathique se met à pulser spontanément. Ce fait que j'étudie en ce moment avec G. COPPÉE \*) est susceptible de rendre compte du contraste qui existe entre l'ypérite qui est indolore, insidieuse, et la chloropierine qui irrite au plus haut point.

f) Il semble cependant que les propriétés physiques de ces toxiques de guerre constituent le plus important des facteurs qui déterminent les propriétés vésicantes ou lacrymogènes. La plupart de nos expériences ont été faites en solution aqueuse de façon à assurer une concentration déterminée pendant un temps voulu. Si l'on veut transposer ces faits en toxicologie de guerre, il ne faut pas oublier que les toxiques ne peuvent pénétrer que par les poumons ou par la peau. Par exemple, en ce qui concerne la peau, un inhibiteur puissant de la glycolyse sera sans action s'il est insoluble dans les graisses. En effet, les corps insolubles dans les graisses ne pénètrent pas dans la peau; ils ne peuvent traverser la couche superficielle de l'épiderme ni s'insinuer le long du poil. C'est le cas du monoiodoacétate de sodium qui, à l'état de cristaux ou de solution concentrée est sans action quand on le dépose sur la peau. D'autre part, les liquides volatils ou les gaz ont plus de chance d'être lacrymogènes puisque la conjonctive, riche en groupes  $-SH$  superficiels est moins bien protégée que la peau. Par exemple, le monoiodoacétate d'éthyle, le plus violent lacrymogène, n'est vésicant que si on expose la peau à des vapeurs très concentrées.

Le Tableau III qui résume ces faits, montre qu'en modifiant les propriétés physiques d'un même radical actif, on obtient trois corps dont l'effet toxique est en apparence tout différent. En réalité, si on les met en solution aqueuse, ces trois corps sont des inhibiteurs de la glycolyse, ils donnent l'effet LUNDGAARD et on est parfaitement en droit de dire que leur action physiologique fondamentale est la même.

TABLEAU III.

Corps	Lacrymogène	Vésicant	Propriétés physiques
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{I}-\text{C} \\ \diagdown \\ \text{O}-\text{Na} \end{array}$	0	0	Solide, insoluble dans les graisses
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{I}-\text{C} \\ \diagdown \\ \text{O}-\text{H} \end{array}$	0	+++	Solide, tension de vapeur faible, soluble dans les graisses
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3\text{I}-\text{C} \\ \diagdown \\ \text{O}-\text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	++++	+	Liquide volatil

**3ème objection.** On nous a demandé pourquoi nous nous refusons à faire rentrer ces lésions par substances chimiques définies dans le groupe des lésions inflammatoires d'origine microbienne. Par exemple, certaines lésions étendues de la peau par l'ypérite ressemblent de façon frappante à l'érysipèle.

On peut, en effet, exprimer les faits en disant que l'ypérite ou l'acide monoiodoacétique déterminent une „inflammation” de la peau. Nous préférons toutefois éviter d'employer ce terme d'inflammation parce qu'il n'ajoute rien à ce que nous avons décrit ci-dessus et parce qu'il risque d'amener une confusion entre d'une part les données nombreuses mais encore assez con-

\*) Arch. internat. Physiol. 51, 35 (1941).

fuses de pathologie bactérienne et d'autre part les faits simples et précis que nous avons observés. Que certaines modifications vasculaires, que des changements de perméabilités, qu'une libération de corps histaminiques soient communs à l'inflammation bactérienne et à l'inflammation chimique, nous n'en disconvenons pas. L'oedème est une réaction générale banale qu'on rencontre dans des lésions d'origine multiple.

L'intérêt de nos recherches réside essentiellement en ceci qu'elles portent sur le mécanisme d'attaque de la cellule, sur ce qui précède l'apparition de l'oedème. Ne peut-on pas retourner la question et se demander si l'étude des groupes —SH, des activités enzymatiques des cellules enflammées par les toxines bactériennes, ne devrait pas être entreprise à la lumière des faits mis en évidence dans l'inflammation chimique?

**4ème objection.** Notre théorie ne mentionne pas l'intervention du système nerveux dans le mécanisme de la vésication. Or, les expériences de BRUCE<sup>20</sup>) et de LEWIS, jointes à certaines données pharmacologiques (HOFMANN<sup>21</sup>)) font jouer un rôle prépondérant aux réflexes vasodilatateurs axoniques dans l'action des irritants chimiques et notamment de l'essence de moutarde. En réalité, les travaux de LEWIS et de BRUCE ne portent que sur les phénomènes vasculaires du début de l'inflammation par l'isosulfocyanate d'allyle (halo rougeâtre, phénomènes capillaires etc.).

WYBAUW<sup>22</sup>) qui a étudié l'effet du badigeonnage de l'oreille de Lapin à l'essence de moutarde, est formel dans ses conclusions: „On saisit tout au moins chez le Lapin, un stade hyperémique de début avec rougeur et oedème discret qui est conditionné par la présence des fibres de la sensibilité et dû, comme dans les épreuves du premier groupe, aux réflexes axoniques vasodilatateurs. Mais bientôt apparaît un oedème massif qui, aussi bien chez le Chat que chez le Lapin est au contraire favorisé par la dégénérescence des fibres sensitives. . . . L' oedème, dans ces brûlures graves, ne dépend vraisemblablement pas de la vasodilatation; ce n'est pas un simple oedème de transsudation. Il est en effet le plus accentué du côté où la vasodilatation initiale est la plus discrète ou même fait défaut.” Alors qu'une oreille normale badigeonnée à l'essence de moutarde est à peu près complètement cicatrisée en 6 à 7 semaines, l'oreille énervée reste encore grosse après 3 mois et pourvue de larges croûtes brunâtres.

Que la sensation de cuisson et le halo rouge si remarquables dans l'action des acides acétiques monohalogénés sur la peau humaine, soient abolis par l'énervation sensible, il n'y a aucun doute. De même on supprimerait l'action lacrymogène de la chloropierine en sectionnant le trijumeau. Mais, dans le premier cas, l'oedème, la phlyctène, l'escharre persisteraient et, dans le second cas, l'attaque de la conjonctive ne serait pas arrêtée.

Nous avons donc le droit de ne pas mentionner l'influence du système nerveux dans cette étude qui ne porte pas sur les effets vasculaires des vésicants, ni sur les actions sur les terminaisons sensibles de la peau et des muqueuses à propos desquelles HEUBNER<sup>23</sup>) a écrit un mémoire très pertinent.

**5ème objection.** Si les toxiques de guerre agissent comme les acides acétiques monohalogénés, s'ils produisent l'effet LUNDGAARD sur le muscle de Grenouille isolé, pourquoi ne font-ils pas apparaître en injection intraveineuse la raideur musculaire généralisée qu'a décrite LUNDGAARD<sup>2a</sup>) chez le Lapin (20 mg par kg d'acide moniodoacétique neutralisé)?

En effet, sans avoir recherché systématiquement à reproduire ce phénomène, nous ne l'avons jamais observé ni chez le Mammifère anesthésié, ni chez la Grenouille, avec des vésicants ou des toxiques de guerre. MAGNE, MAYER et PLANTEFOL<sup>24</sup>) ont toutefois signalé chez certains ypérités de la guerre 1914—1918, une raideur musculaire particulière qui pourrait reconnaître l'effet LUNDGAARD pour cause.

Etant donné les affinités variables des groupes —SH des diverses protéines, on peut très bien concevoir que le moniodoacétate injecté se fixe principalement dans le muscle, alors que la chloropierine s'attaquerait de préférence aux muqueuses. J'en vois une indication dans ce fait qu'on ne provoque pas l'oedème du poumon par injection de monobromoacétate chez le Chat ou le Chien anesthésiés (15 mg par kg) alors qu'avec 7 à 10 mg de chloro- ou de bromopierine administrés dans les mêmes conditions, on détermine en 1 à 2 heures un oedème aigu du poumon

mortel chez ces deux animaux. Pour voir l'action oedématisante au niveau du poumon, il faut, dans le cas du monoiodoacétate s'adresser à une circulation coeur-poumons à la STARLING (RÜHL et THADDEA<sup>10</sup>), c'est à dire éliminer les muscles squelettiques.

Ajoutons que les vésicants et toxiques de guerre bloquent la conduction de l'influx nerveux à des concentrations beaucoup plus faibles que les monoiodo et monobromacétates (BACQ et COPPÉE, observations en partie inédites). On a donc d'amples raisons pour ne pas s'arrêter à cette objection.

**6ème objection.** S'il est exact que le blocage définitif des groupes —SH est une étape nécessaire dans le mécanisme de la vésication, tout système oxydant susceptible de bloquer irréversiblement les groupes sulfhydryles de la peau doit être vésicant ou escarriquant.

Nous n'avons pas encore examiné à fond ce corollaire de notre théorie, mais il est une expérience bien simple à la portée de tous qui confirme d'ailleurs des faits d'observation courante.

Le peroxyde d'hydrogène (pur, 100 volumes) étalé sur une coupe de peau fait disparaître au bout de 30 à 60 minutes les groupes —SH de l'épiderme; dans le bulbe pileux ces groupes sont un peu plus résistants. Cette oxydation est irréversible, le cyanure étant incapable de faire apparaître à nouveau une coloration par le nitroprussiate. Donc cet oxydant énergique agit à ce point de vue comme la chloropicrine et les acides acétiques monohalogénés. Les effets du perhydrol sur la peau étant mal décrits, j'ai fait sur moi-même l'essai suivant que je conseillerais de faire à ceux qui pourraient conserver un doute sur la réalité du fait. Déposer et étaler avec un fin pinceau quelques gouttes de perhydrol MERCK sur la peau du dos de l'avant bras (surface circulaire de 1 cm de diamètre environ). Après un délai de 4 à 5 minutes, vives sensations de piqures; des points blancs, mats apparaissent; la surface enduite de perhydrol se surélève; au bout de 20 à 30 minutes, on voit et on sent nettement un oedème blanc surélevé sur un fond rouge et chaud. C'est le halo de vasodilatation visible dans l'attaque de la peau par les acides acétiques monohalogénés. Les sensations de piqures disparaissent  $\frac{3}{4}$  à 1 heure après application du perhydrol; l'oedème se tasse. Seize à vingt-quatre heures après, des vésicules pleines d'un liquide clair se détachent sur l'épiderme de teinte saumonée.

Ainsi donc, le corollaire se vérifie aisément; le perhydrol répond exactement à la définition d'un vésicant. J'ajouterai que l'effet LUNDGAARD est très marqué quand on fait agir l'eau oxygénée (1  $\frac{1}{2}$  vol. %) sur un rectus isolé de Grenouille et que le perhydrol (0,03 cc) en injection intradermique dans l'oreille du Lapin fait apparaître un fort oedème de toute l'oreille.

**7ème objection.** Le fluorure de sodium inhibe la glycolyse et il n'est ni vésicant ni escarriquant.

L'action antiglycolytique du fluorure ne reconnaît pas un mécanisme identique à celui de l'inhibition par les acides acétiques monohalogénés. Ce sel ne réduit pas les groupes —SH libres: il ne donne qu'un effet LUNDGAARD incomplet (BACQ, GOFFART et ANGENOT<sup>2</sup>), et, pour autant qu'on puisse en juger par les effets d'une solution saturée, il n'est pas escarriquant chez le Chien en injection intradermique. Il semble donc que, pour être vésicant, un corps doive inhiber la glycolyse d'une façon bien déterminée et nous sommes enclins à considérer que le blocage définitif des groupes sulfhydryles est un facteur d'importance primordial. Nous espérons que nos recherches permettront dans l'avenir de départager les adversaires et les partisans de la théorie qui interprète l'action des acides acétiques monohalogénés par le blocage des groupes —SH. Nous signalerons toutefois le fait suivant à titre d'exemple d'un parallélisme entre certains effets et la rapidité d'attaque des groupes —SH. Les toxiques de guerre et vésicants que nous avons étudiés à ce point de vue (chloropicrine, bromopicrine, isosulfocyanate d'allyle, sulfone de l'ypérite, chloracétophénone) déterminent, en injection intraveineuse chez le Chien, le développement d'un oedème aigu du poumon. Or cet oedème est d'autant plus précoce que la réaction du toxique avec les groupes —SH de la peau est rapide; mort en 1 à 2 heures avec la chloro- et la bromopicrine, en cinq heures avec l'isosulfocyanate et la sulfone. L'oedème du poumon, les lésions bronchiques sont l'homologue des lésions cutanées et oculaires; il n'y a aucune raison d'envisager une pathogénie particulière des lésions de l'arbre respiratoire.

Ainsi donc, les objections que soulève notre théorie ne résistent pas à un examen approfondi. Bien plus, certains caractères essentiels de la vésication reçoivent une interprétation simple et logique.



I. On ne saurait trop insister sur la différence qui sépare un vésicant d'un caustique, différence dont notre théorie rend compte. Le caustique agit même sur une peau morte, sur du cuir, sur une étoffe de laine ou de coton, alors que l'application d'un vésicant sur un cadavre reste sans effet. L'ypérite traverse le cuir, elle ne le „mange” pas. La vésication est une réaction vitale des cellules de la peau alors que la brûlure par un caustique, acide, basique ou salin, n'est qu'une réaction banale de la matière organique. Parler de l'action „caustique” de l'ypérite est une grave erreur de langage. Le caustique agit sans délai alors que la phlyctène n'apparaît que 2 à 10 heures après l'application des vésicants les plus puissants. A ce propos, nous considérons comme significatif le fait que l'action vésicante des acides iodo- et bromoacétiques est plus rapide que celle de l'ypérite. N'avons nous pas observé que l'effet LUNDGAARD, l'action antiglycolytique et l'attaque des groupes —SH sont plus lents dans le cas de l'ypérite que dans celui de ces deux acides?

II. La grande rapidité d'action des lacrymogènes s'explique 1° par la fragilité et le manque de protection des groupes —SH de la conjonctive; 2° par le fait que la sécrétion des larmes, de nature réflexe, est provoquée par de très faibles irritations de la conjonctive et de la cornée. Le liquide qui s'accumule dans la phlyctène n'est pas sécrété par une glande, c'est un exsudat, une lymphe dont la formation manifeste une grande indépendance vis-à-vis du système nerveux. En somme, l'homologue de l'action lacrymogène, c'est, en ce qui concerne la vésication, le halo de vasodilatation cutanée qui se développe moins d'une minute après application de certains vésicants.

III. On entrevoit, pour la majeure partie des vésicants la cause des relations entre la structure et l'action physiologique.

A de rares exceptions près, ces corps contiennent tous un halogène ou un groupe CN ou SCN qui se comporte comme un halogène. Cet halogène est l'élément actif. A vrai dire, les halogènes à l'état moléculaire ont certaines des actions pharmacologiques qu'on reconnaît à leurs composés organiques: le chlore est suffocant; les vapeurs de brome et d'iode sont lacrymogènes et irritent les muqueuses. Les cliniciens et les pharmaciens savent que la vieille teinture d'iode où s'est formé de l'acide iodhydrique et hypoiodéux est non seulement un révulsif mais un vésicant léger pour les peaux sensibles. De plus elle pique au nez.

Le soufre dans la molécule d'ypérite ne joue pas un rôle primordial; il n'est pas l'élément toxophore ainsi que le veulent certaines théories applicables uniquement à la famille de l'ypérite. Notre théorie postule que dans la molécule vésicante, l'halogène doit être assez proche du carbone pour que la molécule soit stable et cependant assez labile pour permettre l'accrochage de certains —H. C'est ainsi que le bromure de benzyle est lacrymogène et escarifiant en injection, qu'il inhibe la glycolyse, alors que ses isomères, le m- et le p- bromotoluène, ne sont pas escarifiants et ne font pas apparaître l'effet LUNDGAARD. L'atome de brome fixé directement au noyau est moins labile que dans une chaîne latérale.

On sait depuis longtemps que dans la série de l'ypérite, la chaîne à deux atomes de carbone est celle qui permet l'obtention des dérivés les plus actifs. Si on raccourcit ou si on allonge cette chaîne, la propriété vésicante disparaît ou s'atténue. Le même fait est connu en ce qui concerne l'action antiglycolytique des acides gras monohalogénés; les plus actifs sont les dérivés de l'acide acétique \*).

Fait remarquable: dans trois séries différentes: celle de l'éthane, celle de l'acide acétique et celle de l'ypérite, si on surchlorure le dérivé monohalogéné, si on accroche plus d'un atome d'halogène au carbone, l'action vésicante et antiglycolytique disparaît. L'acide trichloracétique, fortement dissocié, est un caustique précipitant des protéines; l'acide dichloracétique tient le milieu entre le dérivé mono- et le dérivé trihalogéné; il produit encore un léger effet LUNDGAARD après avoir été neutralisé.

Le dichloréthane symétrique (1,2)  $\text{CH}_2\text{Cl}-\text{CH}_2\text{Cl}$ , produit l'effet LUNDGAARD et diminue fortement la réaction du muscle de Grenouille aux ions  $\text{K}^+$ ; il n'a qu'un chlore attaché à chaque

\*) Cette chaîne à deux atomes de carbone se retrouve dans nombre d'autres molécules à action biologique intense; l'adrénaline, la choline, les phénoxyéthylamines et autres sympathicolytiques de synthèse; les antifibrillants préparés dans le laboratoire du Dr. FOURNEAU à Paris etc.

carbone. Son isomère asymétrique, le dichloréthane  $1/1 \text{ CHCl}_2\text{—CH}_3$ , où les deux atomes de chlore sont attachés au même carbone, agissant sur le muscle homologue d'une même Grenouille, à la même concentration, pendant le même temps, détermine une diminution d'effet des ions  $\text{K}^+$ , et un effet LUNDSGAARD beaucoup plus faibles.

IV. L'importance primordiale des groupes  $\text{—SH}$  dans la physiologie de la peau nous est confirmée par HAMMET. Cet auteur démontre que le benzylmercaptan, c'est-à-dire un corps synthétique avec un groupe  $\text{—SH}$  libre, est un excitant remarquable de l'épithélium cutané de la souris. Après 6 mois de traitement avec un solution à 5% de benzylmercaptan dans la glycérine, l'épiderme double d'épaisseur, sa structure microscopique est complètement changée; dans certains cas même, cet état d'intense prolifération va jusqu'à la production de papillomes.

Ce travail, joint au nôtre, fait entrevoir des possibilités thérapeutiques remarquables. Il est certain que les mercaptans, les acides aminés et polypeptides porteurs de groupes  $\text{—SH}$  libres doivent être considérés à la suite de notre étude comme de vrais antidotes des vésicants. L'expérience clinique nous dira si nos espoirs sont fondés.

Indiquons encore une conséquence du blocage définitif des groupes  $\text{—SH}$  par les vésicants et de la formation probable d'un complexe d'addition: la kératinisation devient impossible, puisque la molécule de kératine est orientée autour d'une ferme soudure  $\text{—S—S—}$  (ASTBURY et Woods<sup>26</sup>) que peut seul rompre un certain potentiel d'oxydoréduction réalisé dans l'estomac des insectes kératinivores (mites).

### Conclusion.

Les vésicants, suffocants et lacrymogènes utilisés comme agents thérapeutiques ou comme toxiques de guerre, agissent comme les acides acétiques monohalogénés; ils attaquent les groupes  $\text{—SH}$  libres du glutathion et des protéines; ils inhibent la fermentation lactique.

Une théorie cohérente peut être basée sur ces faits.

### Addendum.

(reçu 28.III.41.)

Depuis l'envoi de ce travail, nous avons pris connaissance de plusieurs publications antérieures à nos recherches et ayant trait au mode d'action des vésicants. Nous regrettons de les avoir ignorées et de ne pas les avoir mentionnées dans nos publications antérieures. Certains faits relatés dans le mémoire ci-dessus comme originaux confirment les résultats de BERENBLUM, KENDAL et ORR (Biochem. JI. **80**, 709, 1936), de PETERS (Nature, **188**, 327, 1936) et de JANY et SELLEI (Bioch. Zs. **275**, 234, 1935).

BERENBLUM et ses collaborateurs ont observé que l'ypérite et sa sulfone, ainsi que la cantharidine inhibent plus fortement la glycolyse que la respiration du sarcome de JENSEN broyé. Il semble donc que la difficulté soulevée à la page 11 de notre travail à propos de la respiration des levures soit en partie résolue. Ces trois vésicants agissent bien comme l'acide monoiodoacétique. BERENBLUM et ses collaborateurs observent que le sulfoxyde de l'ypérite et le thiodiglycol n'inhibent pas la glycolyse plus que la respiration. De même JANY et SELLEI ont observé que la glycolyse anaérobie du carcinome de rat est inhibée presque totalement (94 %) par l'ypérite.

La note de PETERS relate ce fait que la sulfone de l'ypérite a la même action que l'acide monoiodoacétique sur le métabolisme du cerveau. Ces deux corps, à faible concentration (0.000174 M pour la sulfone) inhibent l'oxydation du pyruvate mais n'ont pas d'effet sur la conversion du lactate en pyruvate. PETERS établit que cette action n'est pas due à l'inactivation de la vitamine  $\text{B}_1$  et, dans une dernière phrase, attire l'attention sur la similitude des effets vésicants de la sulfone et de l'acide monoiodoacétique.

Ainsi donc, dans l'ignorance des travaux cités ci-dessus, nous étions arrivés par des voies toutes différentes à des conclusions identiques. Toutefois, une action sur les groupes sulphydriles n'a pas été envisagée par ces auteurs. BERENBLUM et WORMALL (Biochem. JI. **88**) pour expliquer la modification des propriétés antigéniques du serum de cheval traité par l'ypérite, admettent le point de vue de LAWSON et REID. Ils pensent que l'ypérite s'attaque aux groupes  $\text{—NH}_2$  des protéines. Notre hypothèse qui fait de l'inactivation de la fonction sulphydrile le point de départ de l'action vésicante rend parfaitement compte des résultats de BERENBLUM et WORMALL.

- 1) Z. M. Bacq, M. Goffart, Soc. Biol. **133**, 696 (1940). — 2) Z. M. Bacq, M. Goffart, P. Angenot, Bull. Acad. Roy. Méd. Belg. **1940**, 225. — 2a) E. Lundsgaard, Bioch. Zs. **217**, 162 (1930); **227**, 51 (1930). — 3) Z. M. Bacq, P. Angenot, Soc. Biol. **134**, 105 (1940). — 4) Friedmann, Graeser, Jl. of Biol. Chem. **100**, 291 (1933). — 5) F. Dickens, Biochem. Jl. **27**, 1141 (1933). — 6) L. Rapkine, Soc. Biol. **112**, 790, 1294 (1933). — 7) Ray, Guha, Das, Jl. of Chem. Soc. **115**, 1808 (1919); **121**, 323 (1922). — 8) Nekrassow, Melnikow, Ber. Chem. Ges. **62**, 2071 (1929). — 9) E. Walker, Biochem. Jl. **19**, 1085 (1925). — 10) A. Rühl, S. Thaddea, Zs. exp. Med. **100**, 306 (1937). — 11) C. Hederer, M. Istin, L'arme chimique et ses blessures, Baillière, Paris, 1935. — 12) L. Dautrebande, Les gaz toxiques, Masson, Paris, 1933. — 13) R. A. Peters, E. Walker, Biochem. Jl. **17**, 260 (1923). — 14) W. Davies, Jl. of Chem. Soc. **117**, 299 (1920). — 15) Nekrassow, Jl. für prakt. Chem. **1927**, II, 117. — 16) Steinkopff, Ber. Chem. Ges. **53**, 1007 (1929). — 17) O. Muntch, Leitfaden der Pathologie und Therapie der Kampfstoffkrankungen, Thieme, Leipzig, 1936. — 18) H. Büscher, Grün- und Gelbkreuz, Himmelheber, Hamburg, 1932. — 19) Z. M. Bacq, Arch. internat. Pharm. Thé. **63**, 59 (1939). — 20) A. N. Bruce, Arch. für exp. Path. **63**, 424 (1910). — 21) H. Hofmann, Arch. für exp. Path. **196**, 87 (1940). — 22) L. Wybauw, Arch. internat. Phys. **46**, 293 (1938). — 23) W. Heubner, Arch. für exp. Path. **107**, 129 (1925). — 24) A. Mayer, H. Magne, L. Plantefol, Bull. Soc. Chim. Biol. **3**, 9 (1921). — 25) F. S. Hammet, Protopl. **13**, 331 (1931). — W. T. Astbury, H. J. Woods, Trans. Roy. Soc. London A **232**, 333 (1933).

# Die Bestimmung der Fructose in Gegenwart von Saccharose und Glucose

VON

TADASHI YOSHIDA UND KAZUO YAMAFUJI

(Inst. f. Bioch. am Kaiserl. Inst. f. Zuckerforsch.,  
Taiwan, Japan).

(28.I.41.)

In der vorhergehenden Arbeit haben wir zwei Methoden zur Glucosebestimmung bei Anwesenheit von Rohrzucker und Fruchtzucker mitgeteilt (1). Um die Fructosemenge nach dieser Methoden zu ermitteln, muss man von dem gesamten reduzierenden Zucker, dessen Menge nach den ebenfalls von uns früher mitgeteilten Verfahren (2) bestimmt werden kann, den Glucosegehalt subtrahieren. In der vorliegenden Angabe wird über drei Methoden berichtet, die in Gegenwart von Saccharose und Glucose eine direkte Bestimmung der Fructose ermöglichen.

## I. Bestimmung mit alkalischer Kaliumferricyanidlösung.

**Das erste Verfahren:** 2 ccm einer Kaliumferricyanidlösung (6,6 g  $K_3FeCy_6$  in 1000 ccm Wasser) in ein Proberöhrchen gebracht, 5 ccm Natriumcarbonat-Natriumphosphat-Lösung (60 g  $Na_2CO_3$  + 100 g  $Na_2HPO_4$  in 1000 ccm Wasser) und 5 ccm Zuckerlösung hinzugefügt. Das Röhrchen wird sorgfältig geschüttelt und dann 30 Minuten auf 50° erwärmt. Die Mischung wird nach dem Abkühlen mit kaltem Wasser in einen kleinen ERLLENMEYER-Kolben eingetragen und hierauf 5 ccm 20%iger Zinksulfatlösung, 5 ccm 20%iger Kaliumjodidlösung und 10 ccm 40%iger Essigsäure zugesetzt. Schliesslich wird das frei gewordene Jod mit 0,005 n Thiosulfat titriert. Zur Ermittlung der durch Zucker verbrauchten K-Ferricyanidmenge muss noch ein Kontrollversuch, bei dem 5 ccm Wasser anstatt Zuckerlösung verwendet wird, ausgeführt werden.

Wenn die Reaktionstemperatur noch erhöht wird, so wird der Unterschied zwischen dem Ferricyanidverbrauch durch Fructose und demjenigen durch Glucose oder Saccharose allmählich kleiner (Tabelle I). Die Temperatur über 50° ist daher für die Bestimmung der Fructose in Gemischen von Saccharose, Glucose und Fructose ungeeignet.

TABELLE I.

Temperatur in °C	Zugesetzter Zucker			Temperatur in °C	Zugesetzter Zucker		
	1,25 mg fructose	1,25 mg Glucose	1000 mg Saccharose		1,25 mg Fructose	1,25 mg Glucose	1000 mg Saccharose
	Ferricyanidverbrauch in ccm Thiosulfat				Ferricyanidverbrauch in ccm Thiosulfat		
30	0,20	0,03	0,02	70	7,50	5,90	1,10
40	1,75	0,20	0,15	80	7,55	7,40	1,60
50	4,40	0,40	0,35	90	7,55	7,50	2,40
60	7,20	2,00	0,70	100	7,55	7,50	3,00

Ist die Reaktionsdauer zu lang, so verbraucht auch Glucose eine genügend grosse Menge Ferricyanid (Tabelle II). Dementsprechend darf bei der Fructosebestimmung die Lösung nicht mehr als 30 Minuten erwärmt werden.

TABELLE II.

Reaktions- dauer in Min.	Zugesetzter Zucker			Reaktions- dauer in Min.	Zugesetzter Zucker		
	1,25 mg Fructose	5,00 mg Glucose	1000 mg Saccharose		1,25 mg Fructose	5,00 mg Glucose	1000 mg Saccharose
	Ferricyanidverbrauch in cem Thiosulfat				Ferricyanidverbrauch in cem Thiosulfat		
5	1,70	0,40	0,08	45	5,60	3,30	0,50
10	2,40	0,80	0,15	60	6,50	4,20	0,65
20	3,50	1,50	0,25	90	7,60	6,10	0,80
30	4,40	2,20	0,35	120	—	7,80	1,00

Auf Grund dieser Versuche wurden dann die durch bestimmten Mengen von Fructose, Glucose und Saccharose reduzierten Ferricyanidmengen nach dem ersten Verfahren ermittelt (Tabelle III).

TABELLE III.

Fructose in mg	Ferricyanidver- brauch in cem Thiosulfat	Glucose in mg	Ferricyanidver- brauch in cem Thiosulfat	Saccharose in mg	Ferricyanid- verbrauch in cem Thiosulfat
0,25	0,90	1,00	0,50	200,00	0,06
0,50	1,80	2,00	0,95	400,00	0,13
0,75	2,75	5,00	2,20	600,00	0,20
1,00	3,55	10,00	4,10	800,00	0,28
1,25	4,40	15,00	5,80	1000,00	0,35
1,50	5,20	20,00	7,35		
1,75	5,95				
2,00	6,80				

Bei einem Versuch mit einer Mischung von 1 mg Glucose, 1 mg Fructose und 1 g Saccharose wurde eine 4,40 cem 0,005 n Thiosulfatlösung entsprechende Menge K-Ferricyanid verbraucht. Dieser Wert ist, wie aus Tabelle III ersichtlich ist, der Summe des Ferricyanidverbrauchs durch einzelne Zucker gleich.

Für die Reinigung der zuckerhaltigen Lösung werden gewöhnlich Bleiacetat und Natriumphosphat benutzt. Es ist allgemein bekannt, dass Bleiacetat auf die Zuckerbestimmung fast keine störende Wirkung ausübt. Deshalb wurde nun den Einfluss des Entbleiungsmittels auf die Bestimmung der Fructose untersucht. In der verwandten Zuckerlösung waren 1 mg Fructose, 1 mg Glucose und 1 g Saccharose enthalten.

TABELLE IV.

10 %iges $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ in cem	Ferricyanidverbrauch in cem Thiosulfat	10 %iges $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ in cem	Ferricyanidverbrauch in cem Thiosulfat
0	4,40	2,0	4,20
0,5	4,40	5,0	4,10
1,0	4,30		

Wie die Tabelle IV zeigt, muss ein Zusatz einer zu überschüssigen Menge Na-Phosphat vermieden werden.

**Das zweite Verfahren:** Eine Mischung von 2 cem 0,66%iger K-Ferricyanidlösung, 2 cem 2%iger Na-Carbonatlösung und 5 cem Zuckerlösung wird 15 Minuten im siedenden Wasserbad

erhitzt. Nach dem Abkühlen mit Wasser wird die Menge des reduzierten Ferricyanids wie bei dem ersten Verfahren ermittelt.

Die durch verschiedene Mengen von Fructose, Glucose, Invertzucker und Saccharose verbrauchten Ferricyanidmengen wurden nach diesem zweiten Verfahren bestimmt (Tabelle V).

TABELLE V.

Zugesetzter Zucker in mg	Fructose	Glucose	Invertzucker	Zugesetzter Zucker in mg	Saccharose
	Ferricyanidverbrauch in ccm Thiosulfat				Ferricyanidverbrauch in ccm Thiosulfat
0,25	1,36	1,24	1,30	200	0,24
0,50	2,84	2,68	2,76	400	0,50
0,75	4,36	4,10	4,24	600	0,72
1,00	5,82	5,46	5,64	800	1,00
1,25	7,48	6,82	7,20	1000	1,28

Berechnung des Fructosegehaltes: Wenn die zu untersuchende Lösung Fructose allein enthält, so kann man aus dem Thiosulfatverbrauch mit Hilfe der Tabelle VI, die auf Grund der oben beschriebenen sowie noch anderer Versuche gegeben worden ist, direkt die Fructosemenge umrechnen.

TABELLE VI.

Kaliumferricyanidverbrauch in ccm 0,005 n Natriumthiosulfat	Fructose in mg	
	nach dem ersten Verfahren	nach dem zweiten Verfahren
1	0,28	0,185
2	0,56	0,355
3	0,84	0,520
4	1,13	0,690
5	1,43	0,855
6	1,76	1,025
7	2,07	1,175
8	2,38	—

Enthält die zu prüfende Lösung neben Fructose noch Glucose und Saccharose, so muss die Berechnung des Fructosegehaltes in der folgenden Weise ausgeführt werden: Zunächst ist es notwendig, beim ersten Verfahren zur Korrektur für Saccharose, wie aus der Tabelle III ersichtlich ist, vom ermittelten Titer Thiosulfat den Verbrauch durch diesen Zucker zu subtrahieren, in dem Verhältnis, dass 1 g Saccharose 0,33 ccm 0,005 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  entspricht. Da unter den Versuchsbedingungen des ersten Verfahrens das Reduktionsvermögen der Glucose, wie ebenfalls aus Tabelle III umgerechnet werden kann, 14,1% desjenigen der Fructose ist, wird durch die in der Lösung enthaltenen Zucker ( $x$  mg Fructose +  $y$  mg Glucose) die  $x + 0,141 y = a$  (Formel I) entsprechende Menge Ferricyanid verbraucht; dabei kann  $a$  aus dem vorher für Saccharose korrigierten Titer Thiosulfat und aus den für das erste Verfahren gegebenen Daten in Tabelle VI leicht berechnet werden.

Da nach dem zweiten Verfahren die gesamte reduzierende Wirkung der zu untersuchenden Lösung, die neben Fructose und Glucose noch Saccharose enthält, bestimmt wird, muss man vor der Berechnung des Fructosegehaltes, wie bei dem ersten Verfahren, von der titrierten Menge Thiosulfat den Verbrauch durch Rohrzucker abziehen, in dem Verhältnis, dass 1 g

Saccharose = 1,26 cem 0,005 n  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ist (vgl. Tabelle V). Beim zweiten Verfahren entspricht die Reduktionsfähigkeit der Glucose 92,9% derjenigen der Fructose. Dementsprechend ist die Gesamtmenge (b mg) von Fructose (x mg) und Glucose (y mg) in der zu prüfenden Lösung  $x + 0,929 y = b$  (Formel II), wobei b, wie beim ersten Verfahren, aus dem für Saccharose korrigierten Thiosulfatverbrauch mit Hilfe der Tabelle VI direkt umgerechnet wird. Aus den Formeln I und II können wir leicht den Gehalt an Fructose sowie an Glucose berechnen.

Wir haben nun nach dieser Methode die Fructose- und Glucosemenge in einigen Handelsrohrzuckern und im Zuckerrohr bestimmt (Tabelle VII).

TABELLE VII.

	Fructose in %	Glucose in %		Fructose in %	Glucose in %
Handelsrohrzucker	0,062	0,089	Junges Zuckerrohr	0,053	0,069
Handelsrübenzucker	0,030	0,054	Reifes Zuckerrohr	1,640	1,721

## II. Bestimmung mit Luffscher Lösung.

In einer früheren Mitteilung wurde eine Methode zur Zuckerbestimmung mit Luffscher Lösung berichtet (3). Wir haben in der vorliegenden Untersuchung diese Lösung zur Bestimmung der Fructose in Gegenwart von Glucose und Saccharose benutzt.

25 cem Luffscher Lösung werden mit 25 cem Zuckerlösung versetzt. Die Mischung wird auf 60° erwärmt und nach 30 Minuten mit kaltem Wasser abgekühlt; zu der erkalteten Lösung gibt man 25 cem verdünnter Schwefelsäure (1 Vol.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 5 Vol. Wasser) und 15 cem 20%iger KJ-Lösung und titriert mit 0,1 n Na-Thiosulfat. Unter den gleichen Bedingungen wird auch ein Blindversuch ohne Zucker ausgeführt.

Dass bei der Fructosebestimmung bei Anwesenheit von Glucose die Lösung nicht über 60° erhitzt werden darf, ist aus den folgenden Versuchen ersichtlich.

TABELLE VIII.

Temperatur in °C	Zugesetzter Zucker		Temperatur in °C	Zugesetzter Zucker	
	20 mg Fructose	20 mg Glucose		20 mg Fructose	20 mg Glucose
	Reduzierte Cu-Menge in cem Thiosulfat			Reduzierte Cu-Menge in cem Thiosulfat	
40	1,09	—	80	6,17	4,02
50	1,57	—	90	6,22	6,08
60	2,92	0,12	100	6,37	6,27
70	5,68	1,32			

Tabelle VIII zeigt nämlich, dass unter 50° die Luffsche Lösung durch Glucose fast nicht reduziert wird. Um möglichst zu vermeiden, dass Glucose auf die Kupferlösung reduzierend wirkt, ist es nötig, dass die Reaktionsmischung nicht zu lange erwärmt wird (Tabelle IX).

Wir haben dann nach dieser Methode die durch bestimmte Mengen von Fructose und Glucose reduzierten Cu-Mengen ermittelt (Tabelle X).

Unter den Bedingungen dieser Methode übt Saccharose unter 5 g auf die Luffsche Lösung keine reduzierende Wirkung aus (Tabelle XI).

Auf Grund einer Reihe von Versuchen geben wir für die Berechnung der Fructosemenge aus dem Thiosulfatverbrauch folgende Übersicht (Tabelle XII).

TABELLE IX.

Reaktionsdauer in Min.	Zugesetzter Zucker		Reaktionsdauer in Min.	Zugesetzter Zucker	
	25 mg Fructose	125 mg Glucose		25 mg Fructose	125 mg Glucose
	Reduzierte Cu-Menge in cem Thiosulfat			Reduzierte Cu-Menge in cem Thiosulfat	
15	1,56	0,49	60	5,15	2,97
30	3,32	1,22	90	6,44	4,64
45	—	2,00	120	7,03	6,00

TABELLE X.

Fructose in mg	Reduzierte Cu-Menge in cem Thiosulfat	Glucose in mg	Reduzierte Cu-Menge in cem Thiosulfat
2	0,30	25	0,20
5	0,58	50	0,40
10	1,26	125	1,13
20	2,81	250	2,84
25	3,39	375	4,35
30	4,36	500	5,85
40	5,92	625	7,42
50	6,98		
75	10,77		
100	13,77		

TABELLE XI.

Erwärmungsdauer in Min. . . . .	30	60	120
Durch 5 g Saccharose reduzierte Cu-Menge in cem Thio- sulfat . . . . .	0,00	0,05	0,10

TABELLE XII.

0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in cem	Fructose in mg	0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in cem	Fructose in mg	0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in cem	Fructose in mg
0,2	1,4	5,0	35,0	9,8	68,1
0,4	2,8	5,2	36,3	10,0	69,5
0,6	4,2	5,4	37,6	10,2	71,0
0,8	5,6	5,6	38,9	10,4	72,5
1,0	7,0	5,8	40,2	10,6	74,0
1,2	8,4	6,0	41,5	10,8	75,5
1,4	9,8	6,2	42,9	11,0	77,0
1,6	11,2	6,4	44,3	11,2	78,6
1,8	12,6	6,6	45,7	11,4	80,2
2,0	14,0	6,8	47,1	11,6	81,8
2,2	15,4	7,0	48,5	11,8	83,4
2,4	16,8	7,2	49,9	12,0	85,0
2,6	18,2	7,4	51,3	12,2	86,7
2,8	19,6	7,6	52,7	12,4	88,4
3,0	21,0	7,8	54,1	12,6	90,1
3,2	22,4	8,0	55,5	12,8	91,8
3,4	23,8	8,2	56,9	13,0	93,5



TABELLE XII (Fortsetzung).

0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in ccm	Fructose in mg	0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in ccm	Fructose in ccm	0,1 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in ccm	Fructose in mg
3,6	25,2	8,4	58,3	13,2	95,2
3,8	26,6	8,6	59,7	13,4	96,9
4,0	28,0	8,8	61,1	13,6	98,6
4,2	29,4	9,0	62,5	13,8	100,3
4,4	30,8	9,2	63,9	14,0	102,0
4,6	32,2	9,4	65,3		
4,8	33,6	9,6	66,7		

Zur Berechnung des Zuckergehaltes der nur Fructose enthaltenden Lösung werden die Daten in der Tabelle XII direkt benutzt. Bei der Bestimmung der Fructose in Gegenwart von Glucose und Rohrzucker ist eine Korrektur nur für Glucose notwendig; denn hierbei findet, wie oben erwähnt, keine Reduktion der Luff'schen Lösung durch Saccharose statt. Die reduzierende Kraft der Glucose entspricht, wie aus den Zahlen in Tabelle IX umgerechnet werden kann, 7,57% derjenigen der Fructose. Bei der x mg Fructose sowie y mg Glucose enthaltenden Lösung ist daher der ermittelte Thiosulfatverbrauch der durch  $x + 0,0757 y = a$  (Formel III) entsprechende Menge Fructose verbrauchten Thiosulfatmenge gleich. Hierbei kann a mit Hilfe der Tabelle XII leicht berechnet werden. Andererseits wird die Gesamtmenge (b mg) von Fructose (x mg) und Glucose (y mg) in der Lösung nach der von uns früher mitgeteilten, zweiten Methode <sup>(2,3)</sup> bestimmt. Da aber unter den Bedingungen dieser Methode das Reduktionsvermögen der Glucose demjenigen der Fructose gleich ist, ist  $x + y = b$  (Formel IV). Die Menge der Lävulose sowie der Glucose werden aus diesen beiden Formel III und IV berechnet.

Die Analyse des Handelszuckers wurde mit der Luff'schen Lösung in der oben beschriebenen Weise durchgeführt (Tabelle XIII).

TABELLE XIII.

	Fructose in %	Glucose in %		Fructose in %	Glucose in %
Brauner Zucker . .	1,82	2,02	Weisser Zucker. . .	0,13	0,17

### III. Bestimmung mit OFNERScher Lösung.

Wir haben ferner festgestellt, dass auch OFNERSche Lösung <sup>(4)</sup> für die Fructosebestimmung in Gegenwart von Glucose und Saccharose anwendbar ist. Die zu diesem Zwecke erforderlichen Reagenzien sind folgende:

1. 5 g krystallisiertes Kupfersulfat + 10 g wasserfreies Natriumcarbonat + 50 g krystallisiertes Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ) + 800 g Seignettesalz in 1000 ccm Wasser (OFNERSche Lösung).
2. 0,0823 n Jodlösung: 10 g Kaliumjodid + 2,05 g Jod in 500 ccm Wasser.
3. 0,0823 n Natriumthiosulfatlösung, gegen Jod eingestellt.

25 ccm der zu untersuchenden Lösung werden in einem Reagenzglas mit 25 ccm OFNERScher Lösung 80 Minuten auf 60° im Wasserbad erhitzt. Man kühlt durch Eintauchen in kaltes Wasser, setzt 50 ccm Wasser, 10 ccm 1 n Salzsäure und 15 ccm 0,0823 n Jodlösung hinzu und titriert nach 2 Minuten mit 0,0823 n Thiosulfat gegen Stärke.

Durch Erhitzen über 60° wird der Jodverbrauch durch Glucose viel grösser (Tabelle XIV).

TABELLE XIV.

Temperatur in °C	Zugesetzter Zucker		Temperatur in °C	Zugesetzter Zucker	
	10 mg Fructose	10 mg Glucose		10 mg Fructose	10 mg Glucose
	Jodverbrauch in ccm			Jodverbrauch in ccm	
40	0,15	0,00	80	10,10	5,20
50	0,50	0,05	90	10,30	8,90
60	2,50	0,25	100	10,55	10,40
70	6,75	1,30			

Für die Bestimmung der Fructose bei Anwesenheit der Glucose ist eine längere Erwärmung der Mischung ungeeignet (Tabelle XV).

TABELLE XV.

Reaktionsdauer in Min.	Zugesetzter Zucker		Reaktionsdauer in Min.	Zugesetzter Zucker	
	10 mg Fructose	50 mg Glucose		10 mg Fructose	50 mg Glucose
	Jodverbrauch in ccm			Jodverbrauch in ccm	
15	1,40	0,80	90	8,50	6,00
30	3,00	1,80	120	9,00	8,00
60	6,20	4,00			

Nach der oben erwähnten Methode wurden die durch verschiedene Zuckermengen verbrauchten Mengen Jod ermittelt (Tabelle XVI).

TABELLE XVI.

Fructose in mg	Jodverbrauch in ccm	Glucose in mg	Jodverbrauch in ccm
10	2,80	125	3,90
20	5,50	250	7,65
30	8,10	375	10,70
40	10,70	500	13,55
50	12,90		

Wir haben noch zahlreiche diesbezügliche Versuche ausgeführt und konnten folgende Tabelle erhalten, die zur Umrechnung der Jodwerte auf Milligramm Fructose dient. (Tabelle XVII).

Da unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen die OFNERSche Lösung durch 5 g Rohrzucker nicht reduziert wird, kann das Vorhandensein dieses Zuckers unter 5 g in der zu prüfenden Lösung ignoriert werden. Wie aus den Daten in Tabelle XV ersichtlich ist, ist die Reduktionsfähigkeit der Glucose durchschnittlich 10,98% derjenigen der Fructose. Die durch  $x$  mg Lävulose und  $y$  mg Glucose verbrauchte Menge Jod entspricht deshalb dem durch  $x + 0,109 y = a$  (Formel V) Milligramme Fructose verbrauchten Jodwert; hierbei kann  $a$  mit Hilfe der Tabelle XVII leicht umgerechnet werden. Die Gesamtmenge der beiden Zucker wird andererseits nach der früher berichteten, unserer zweiten Methode zur Bestimmung der reduzierenden Zucker (2.3) ermittelt; dabei ist, wie bei der Fructosebestimmung mit LUFFScher Lösung beschrieben wurde,  $x + y = b$  (Formel VI). Der Fructosegehalt wird aus den Formeln V und VI berechnet.

TABELLE XVII.

0,0828 n Jod in ccm	Fructose in mg	0,0828 n Jod in ccm	Fructose in mg	0,0828 n Jod in ccm	Fructose in mg
0,2	0,7	4,8	17,8	9,4	34,9
0,4	1,4	5,0	18,1	9,6	35,7
0,6	2,2	5,2	18,8	9,8	36,5
0,8	2,9	5,4	19,6	10,0	37,3
1,0	3,6	5,6	20,4	10,2	38,1
1,2	4,3	5,8	21,2	10,4	38,9
1,4	5,0	6,0	22,0	10,6	39,7
1,6	5,8	6,2	22,7	10,8	40,5
1,8	6,5	6,4	23,5	11,0	41,4
2,0	7,2	6,6	24,3	11,2	42,2
2,2	7,9	6,8	25,1	11,4	43,1
2,4	8,6	7,0	25,9	11,6	44,0
2,6	9,3	7,2	26,6	11,8	44,9
2,8	10,0	7,4	27,3	12,0	45,8
3,0	10,6	7,6	28,1	12,2	46,6
3,2	11,3	7,8	28,9	12,4	47,5
3,4	12,0	8,0	29,7	12,6	48,4
3,6	12,8	8,2	30,4	12,8	49,3
3,8	13,6	8,4	31,1	13,0	50,2
4,0	14,4	8,6	31,9		
4,2	15,1	8,8	32,7		
4,4	15,8	9,0	33,5		
4,6	16,5	9,2	34,2		

Die nach dieser Methode bestimmte Fructosemenge im Handelszucker ist folgende (Tabelle XVIII).

TABELLE XVIII.

	Fructose in %	Glucose in %		Fructose in %	Glucose in %
Handelszucker 2 . .	0,066	0,074	Handelszucker 2 . .	0,055	0,078

Wir haben schliesslich einige Handelsrohrzucker mit alkalischer Ferricyanidlösung (I), Lufferscher Lösung (II) und mit Ofnerscher Lösung (III) getrennt nach den oben beschriebenen Methoden analysiert. Die Versuchsbeispiele in Tabelle XIX dienen als Belege für die Leistungsfähigkeit dieser drei Methoden.

TABELLE XIX.

	Fructose in %			Glucose in %		
	Methode I	Methode II	Methode III	Methode I	Methode II	Methode III
Handelszucker 1 . . . . .	0,063	—	0,066	0,089	—	0,087
Handelszucker 2 . . . . .	0,260	0,250	—	0,368	0,364	

1) T. Yoshida, K. Yamafuji, *Enzymol.* **9**, 295 (1941). — 2) T. Yoshida, Y. Iwata, K. Yamafuji, *Enzymol.* **2**, 342 (1938). — 3) K. Yamafuji, T. Yoshida, *Enzymol.* **6**, 229 (1939). — 4) R. Ofner, *Zs. f. Zuckerind. Czech.* **60**, 61 (1935).

# L'action biochimique des dinitrodérivés sur le métabolisme des cellules de levure

PAR

L. VANDENDRIESSCHE

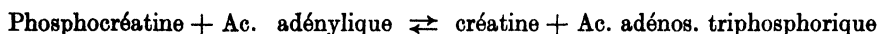
(Lab. chim. physiol., Ec. vétér., Univ. Gand).

(28.I.41.)

L'action des dinitros a été investigée sous différents points de vue, mais c'est surtout comme activateurs de la respiration qu'ils ont retenu l'attention (1). Cette activation a été reproduite sur du tissu broyé et des extraits de tissu, mais jamais on n'a démontré une action sur des ferments ou des extraits fermentaires, qui aurait pu donner une interprétation des phénomènes considérés. La principale hypothèse, que les dinitros seraient des *catalyseurs*, tels que la pyocyanine, le bleu de méthylène et autres indicateurs du potentiel d'oxydo-réduction, a été rejetée par GREVILLE et STERN<sup>2</sup>). En outre, l'action du cyanure, qui neutralise l'effet des dinitros sur la respiration, ne cadre pas avec cette hypothèse, car la respiration portée par le bleu de méthylène n'est pas inhibée par le cyanure.

On sait également que les dinitros stimulent la fermentation lactique du muscle et la fermentation alcoolique des levures (3), mais on n'a jamais montré une action pareille sur des ferments ou des extraits fermentaires. Il est à noter aussi, qu'en concentrations plus fortes, les dinitros ont une action inhibitrice aussi bien sur la respiration que sur la fermentation (4).

EHRENFEST et RONZONI<sup>5</sup>) constatent que la teneur en phosphocréatine du muscle et du muscle haché baisse sous l'influence des dinitros, mais n'observent aucune action sur des extraits musculaires. Ils sont d'avis que les dinitros stimulent la réaction



et que dans un extrait on ne peut observer aucun effet, car la vitesse y serait maximale. Pourtant, ici s'impose une objection: en effet, si la vitesse est maximale, il y a toutefois la vitesse de réaction d'un ferment qui détermine la vitesse du phénomène total: celle du *ferment le plus lent*. Si on parvient à augmenter cette vitesse, on augmentera la vitesse de tout le cycle des réactions. De même, un inhibiteur ne se fera sentir que du moment où l'inhibition d'un ferment ramènera sa vitesse de réaction en dessous de celle du ferment le plus lent. Contre l'hypothèse d'EHRENFEST et RONZONI, relevons aussi que les dinitros stimulent la fermentation alcoolique, ou la réaction susdite est inconnue.

Un fait important reste cependant acquis: les dinitros stimulent aussi bien la respiration que la fermentation tissulaire, ils stimulent aussi bien la respiration que la fermentation des levures. Il nous a semblé logique en ce cas de considérer l'action des dinitros comme un effet sur les réactions communes de ces deux phénomènes. Or quelles sont ces réactions? Il est inutile de détailler ici les réactions de la glycogénolyse. Plus intéressant est-il de noter que la respiration (pour le muscle tout au moins) aurait comme substrat normal les triose-phosphates qui passent par le cycle de réactions des acides dicarboxyliques en  $C_4$  de SZENT-GYÖRGYI<sup>6</sup>), alors par le système WARBURG-KEILIN, et sont finalement oxydés par l'oxygène moléculaire. Cette conception cadre très bien avec certaines observations de KRAHL et CLOWES<sup>7</sup>) et de CORI et CORI<sup>8</sup>).

KRAHL et CLOWES ont constaté, par voie spectroscopique, que le temps de réduction du cytochrome C des levures est notablement raccourci sous l'influence des dinitros, à condition que l'on donne comme substrat du glucose. Si le substrat est du lactate, du pyruvate ou de l'alcool, on ne perçoit aucune activation. Des résultats analogues ont été obtenus par GENEVOIS et SARIC<sup>9</sup>), qui ne trouvent pas d'activation de la respiration en employant l'alcool, l'acétate ou la glycérine comme substrat. Nous avons tenu à confirmer ces résultats — en employant la méthode manométrique —, parce qu'ils revêtent à notre avis une importance capitale: en effet,

ils localisent l'activation causée par les dinitros entre les limites, glucose et acide pyruvique. Nous avons d'ailleurs pu confirmer complètement les résultats des auteurs précités. Nous avons en outre employé comme substrat l'hexosediphosphate et nous n'avons pu démontrer aucune activation par les dinitros, localisant ainsi leur action entre les stades glucose — hexosediphosphate (tableau I).

CORI et CORI<sup>8)</sup>, constatent que, dans le muscle de grenouille imbibé de RINGER contenant du dinitro, la concentration de l'hexosediphosphate augmente, celle de la phosphocréatine diminue, tandis que celle du monophosphate reste inchangée. Quand on considère les réactions impliquées:

1) glycogène + n H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  $\rightleftharpoons$  n hexosephosphate (ester de CORI)

2) ester de CORI  $\rightarrow$  ester d'EMDEN (irréversible, CORI)

3) 2 ester d'EMDEN + ATP \*)  $\rightleftharpoons$  2 ester de HARDEN-YOUNG + ac. adénylique \*\*) et la réaction subséquente:

4) 2 phosphocréatine + ac. adénylique  $\rightleftharpoons$  2 créatine + ATP, on explique aisément tous les faits en admettant une activation de la réaction 3).

Tout ceci nous a porté naturellement à considérer de plus près les réactions que nous venons d'énumérer, et nous a amené à investiger l'influence des dinitros sur la glycogénolyse, et la glycolyse d'extraits fermentaires. Nous avons employé comme extrait fermentaire le suc de LEBEDEV, dont la glycolyse est caractérisée par un temps d'induction très long. Le temps d'induction pendant lequel se forme de l'hexosediphosphate, peut être raccourci par l'addition d'hexosediphosphate ou bien d'ATP (LOHMANN<sup>10)</sup>).

En effet, les réactions qui mènent du glucose à l'hexosediphosphate sont:

2 hexose + ATP  $\rightleftharpoons$  2 hexosemonophosphate + ac. adénylique;

l'existence de cette réaction a été prouvée par VON EULER<sup>11)</sup>, qui démontrait dans le „Zwischenferment” de WARBURG<sup>12)</sup> l'existence d'un ferment, „phosphorylase”, et qui catalyse la réaction susdite. Plus tard, MEYERHOF<sup>13)</sup> a confirmé ce résultat, en démontrant que l'hexokinase transforme les hexoses en hexosemonophosphates à l'aide de l'ATP.

Cette réaction est suivie par la réaction 3) de la glycogénolyse

2 hexosemonophosphate + ATP  $\rightleftharpoons$  2 hexosediphosphate + ac. adénylique,

dont l'existence dans le suc de LEBEDEV a été prouvée par SCHÄFFNER<sup>14)</sup>. L'hexosediphosphate induit indirectement une réaction secondaire

hexose + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  $\rightleftharpoons$  hexosemonophosphate (SCHÄFFNER<sup>14)</sup>), suivie à son tour par la réaction 3).

Nous avons détaillé ces réactions non seulement parce qu'elles ont jusqu'ici attiré peu l'attention, mais surtout parce que nous avons constaté une réduction très sensible du temps d'induction par les dinitros, et ceci avec les dinitrophénols 1.2.4 et 1.2.5 dans des concentrations de 10<sup>-3</sup> M et 10<sup>-4</sup> M; 10<sup>-5</sup> M est près de la limite de l'activation. Le dinitrophénol 1.2.6 par contre n'a aucune influence (tableau II). Ceci est remarquable quand on sait que ce dinitro ne stimule pas la respiration (MAGNE, MAYER et PLANTFOL<sup>1)</sup>). Avec le mannose et le fructose comme substrat, le temps d'induction est aussi notablement raccourci, de même qu'avec le saccharose (tableau III).

D'après MEYERHOF<sup>16)</sup>, avec le glycogène comme substrat, il n'y aurait pas de période d'induction. Nous avons toutefois, et dans toutes nos expériences, noté un temps d'induction, et cela est tout à fait logique puisque l'ATP est aussi bien un facteur limitant pour la glycogénolyse, que pour la glycolyse. Ce temps d'induction est raccourci par les dinitros (tableau IV).

Ajoutons à tout ceci:

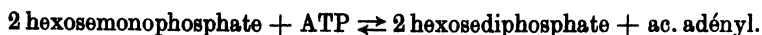
1° — que les dinitros ne produisent aucune activation de la fermentation de l'hexosediphosphate (tableau V). Ceci est à rapprocher de nos résultats établissant que la respiration des cellules de levure n'est pas activée par les dinitros, quand on donne l'hexosediphosphate comme substrat.

2° — qu'ils raccourcissent la période d'induction avec l'hexosemonophosphate (ester de NEU-

\*) ATP = acide adénosinetriphosphorique.

\*\*) ou mieux acide adénosinediphosphorique (LOHMANN).

BRBG) comme substrat (tableau VI). Tout cela nous fait conclure que c'est bien la réaction:



qui est activée par les dinitros, ce qui correspond d'ailleurs parfaitement avec les résultats précités de CORI et CORI.

Avec l'amylum, nous n'avons jamais obtenu une fermentation, ce qui montre que les phosphorolases du glycogène et de l'amylum sont différentes. Pourtant l'activation du métabolisme des glucides des plantes, démontré par PLANTEFOL<sup>17)</sup>, peut aisément être expliquée par nos conclusions, car HANES<sup>18)</sup> a démontré l'existence dans la farine de pois, d'un ferment qui phosphorolyse l'amylum, et d'un autre qui transforme l'hexosemonophosphate, ainsi formé, en hexosediphosphate à l'aide de l'ATP.

Bien que les expériences précitées nous semblent suffisamment probantes, nous avons tenu à les confirmer par d'autres méthodes, et bien par les suivantes:

1° — le suc de LEBEDEW dialysé ne produit que la phosphorolisation du glycogène. Le ferment qui catalyse cette réaction n'est pas activé par les dinitros (tableau VII). En employant ici l'amylum comme substrat nous n'avons pu démontrer aucune disparition du phosphore anorganique.

2° — l'emploi de „Acetonehefe” a donné les mêmes résultats que l'emploi du suc de LEBEDEW.

3° — la phase d'induction, raccourcie par l'ATP ou l'hexosediphosphate, l'est d'avantage par l'ATP ou l'hexosediphosphate, ensemble avec les dinitros.

4° — la disparition du phosphore anorganique est plus rapide en présence de dinitro, aussi bien en employant le glucose que le glycogène comme substrat (tableau VIII).

Enfin, il est à noter que tous ces faits ont été observés avec les dinitrophénols 1.2.4 et 1.2.5, et pas avec le dinitrophénol 1.2.6. Tout ceci nous permet de conclure que c'est bien une réaction commune à la fermentation et la respiration des levures, la fermentation et la respiration tissulaires qui est stimulée.

D'autres faits importants demandent encore à être expliqués. De plus fortes concentrations de dinitro inhibent aussi bien la respiration que la fermentation tissulaires, aussi bien la respiration que la fermentation des levures quel que soit le substrat, mais jamais on n'a pu reproduire ces faits sur des extraits fermentaires ou des ferments. En ce qui concerne les levures, nous avons pu constater, avec le suc de LEBEDEW, une inhibition notable de la formation de  $\text{CO}_2$ , en employant des concentrations de dinitro de  $5 \times 10^{-3}$  M (tableau IX). Le temps d'induction étant raccourci tout comme pour la concentration  $5 \times 10^{-4}$  M, nous pouvons en conclure que l'inhibition a comme siège un stade ultérieur à la formation d'hexosediphosphate.

Une de ces réactions est la décarboxylation. Nous avons, en effet, pu démontrer que la carboxylase est fortement inhibée par les dinitrophénols 1.2.4 et 1.2.5, tandis que le 1.2.6 est beaucoup moins toxique. D'autres dinitros, tels le dinitrocrésol, le dinitrothymol, le dinitro- $\alpha$ -naphthol, le dinitroguajacol et le dinitropentyloxybenzol sont de forts inhibiteurs, tandis que le mononitrophénol p. et le phénol lui-même ne le sont pas (tableau X). La toxicité se fait déjà sentir dans des concentrations de  $10^{-5}$  M.

Ce dernier fait pourrait sembler contradictoire avec notre constatation que la fermentation alcoolique est seulement inhibée pour des concentrations  $10^{-3}$  M à  $5 \times 10^{-3}$  M. L'explication en est pourtant simple: en effet, d'une part notre suc de LEBEDEW contient des quantités très fortes de carboxylase, de telle façon que ce ferment ne devient le facteur limitant de la fermentation que dans des cas extrêmes. Nous avons préparé la carboxylase en diluant le suc de LEBEDEW cent fois.

D'autre part, les protéines adsorbent des quantités assez fortes de dinitro, ce qui a pour effet de donner une idée fautive des concentrations nécessaires au raccourcissement de la période d'induction.

De plus amples expériences ont démontré que l'inhibition de la carboxylase est plus forte

en anaérobiose qu'en aérobiose (tableau XI) et que l'inhibition est réversible (tableau XII).

Nous ne pouvons cependant pas conclure qu'aucun autre ferment n'est inhibé par les dinitros. Ainsi, on pourrait citer que l'oxydation de l'alcool par des levures est entravée par les dinitros. Notons toutefois que d'après WIELAND c.s. <sup>19</sup>) l'oxydation de l'alcool passe par l'acide pyruvique et qu'il suffit donc, d'admettre une inhibition de la carboxylase pour expliquer l'influence des dinitros sur l'oxydation de l'alcool.

FIELD c.s. <sup>4</sup>) ont démontré que l'activation et l'inhibition disparaissent avec l'alcalinité. Nous avons pu confirmer ces faits. En outre nous avons observé les mêmes faits pour nos extraits fermentaires aussi bien pour l'activation de la glycolyse, que pour l'inhibition de la carboxylase (tableaux XIII et XIV).

MEYERHOF <sup>20</sup>) a démontré que le bleu de méthylène raccourcit le temps d'induction, tandis que MICHAELIS <sup>21</sup>) a constaté que le bleu de méthylène inhibe la carboxylase. Ici pourtant, l'inhibition est plus forte en aérobiose et l'inhibition est irréversible (tableau XV).

Il est peut être intéressant de noter que les dinitros, tout comme le bleu de méthylène, sont des hyperthermisants; que la thyroxine, autre hyperthermisant, fait baisser la concentration de la phosphocréatine dans le muscle cardiaque (SCHUMANN <sup>15</sup>)), que CORI et CORI <sup>8</sup>) ont observé une baisse identique causée par les dinitros dans le muscle de grenouille et que toutes les inhibitions et activations que nous avons pu mettre en évidence se rapportent aux dinitrophénols 1.2.4 et 1.2.5, et non au dinitrophénol 1.2.6, qui ne produit pas d'hyperthermie.

### Partie expérimentale.

La plupart des expériences sont faites à l'aide de l'appareil de WARBURG. Sauf avis contraire, l'atmosphère est de l'air et la température est de 26° C.

**I. Influence du dinitrophénol 1.2.5. sur la respiration des cellules de levure avec l'hexose diphosphate comme substrat.** Chaque appareil de WARBURG contient: 0,7 ml. d'une suspension à 1,4% de levure de boulangerie, et respectivement 0,7 mgr. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  M/20 ou de dinitrophénol 1.2.5. (concentration finale  $10^{-5}$  M). Ensuite 0,3 ml. d'hexosediphosphate à 5%. 0,2 ml. de KOH 10% pour absorber le  $\text{CO}_2$ .

Les résultats sont donnés en  $\text{mm}^3$  de  $\text{O}_2$  de 10 en 10 minutes pendant 40 minutes (tableau I).

TABLEAU I.

levure phosphate hexosediphosphate		levure dinitrophénol hexosediphosphate		
50	54	49	54	54
52	46	50	50	51
52	54	44	51	57
58	44	50	48	48
212	198	198	198	200

**II. Influence des dinitrophénols sur la phase d'induction du suc de LEBEDEV avec le glucose comme substrat.** Chaque appareil de WARBURG contient: 0,7 ml. de suc de LEBEDEV, et respectivement: 0,7 ml. de phosphate primaire M/20 ou de dinitrophénol (concentration indiquée). Ensuite 0,8 ml. de glucose (concentration finale M/20).

Nous prenons comme fin de la phase d'induction le moment de la mise en liberté des 300 premiers  $\text{mm}^3$  de  $\text{CO}_2$  (correspondant à peu près à 1 mgr. de glucose).

Le temps est exprimé en minutes (tableau II).

TABLEAU II.

	levure phosphate glucose	levure dinitro 10 <sup>-3</sup> M glucose	levure dinitro 10 <sup>-4</sup> M glucose	levure dinitro 10 <sup>-3</sup> M glucose
Dinitrophénol 1.2.4	140	—	115	130
	140	—	—	135
	65	55	60	65
	120	85		
	75	65		
	75	65		
	115	90		
	150	130		
	85—90	75		
	115	95		
Dinitrophénol 1.2.5	95	—	75	—
	110	40	90	105
	110	30	90	110
	115	40		
	120	30		
	105	30		
	50	20		
	70	30		
	65	35		
	65	30		
	60	25		
	60	25		
	45	20		
	25	15		
Dinitrophénol 1.2.6	40	20		
	50	15		
	115	115	—	—
	125	130	125	125
	130	135	130	130

**III. Influence des dinitros sur la phase d'induction, avec différents substrats.** Chaque appareil de WARBURG contient: 0,7 ml. de suc de LEBEDEW et respectivement 0,7 ml. de phosphate primaire M/20 ou de dinitrophénol 1.2.5 (concentration finale 10<sup>-3</sup> M). Ensuite: 0,3 ml. de fructose (tableau III A) de mannose (tableau III B) ou de saccharose (tableau III C), en concentrations finales de M/20.

Les résultats sont donnés en mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> dans les intervalles indiquées.

TABLEAU III A.

Temps en min.	LEBEDEW phosphate fructose	LEBEDEW dinitro fructose
0— 5	2	10
5—10	10	158
10—15	154	± 320
15—20	± 310	

TABLEAU III B.

Temps en min.	LEBEDEW phosphate mannose	LEBEDEW dinitro mannose
0— 5	0	6
5—10	0	46
10—20	6	± 360
20—30	54	—
30—40	194	—

TABLEAU III C

Temps en min.	LEBEDEW phosphate saccharose	LEBEDEW dinitro saccharose
0— 5	0	12
5—10	2	160
10—15	96	308
15—20	216	294



**IV. Influence des dinitros sur la glycogénolyse.** Chaque appareil de WARBURG contient 0,7 ml. de suc de LEBEDEV, 0,7 ml. de phosphate primaire ou de dinitrophénol 1.2.5 (concentration finale  $10^{-3}$  M), et 0,8 cc de glycogène à 0,5%.

Les résultats sans dinitro sont marqués A, ceux avec dinitro sont marqués B; ils sont données en mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> de 5 en 5 minutes pendant une demi heure (tableau IV).

TABLEAU IV

A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0	12	0	24	2	18	2	16	0	6	0	6
8	20	8	32	18	46	16	42	6	38	6	38
26	22	26	24	42	24	38	20	6	14	6	14
26	22	28	20	24	18	18	18	16	16	20	16
14	20	18	18	16	18	12	18	20	10	20	10
14	22	16	22	14	18	10	16	18	14	20	14

**V. Influence du dinitrophénol 1.2.5. sur la fermentation de l'hexosediphosphate.** Données comme pour le n° IV, à part que le substrat est l'hexosediphosphate à 5%.

TABLEAU V.

Formation de CO <sub>2</sub> après	LEBEDEV phosphate hexosediphosphate	LEBEDEV dinitro hexosediphosphate
5 minutes	14	12
10 minutes	28	24
15 minutes	46	48
20 minutes	64	72

**VI. Influence des dinitros sur la fermentation de l'hexosemonophosphate.** Les données sont les mêmes que pour le n° V, mais le substrat est l'hexosemonophosphate (ester de NEUBERG) à 5%. Les résultats sont donnés en mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> de 5 en 5 minutes pendant 25 minutes (tableau VI).

TABLEAU VI.

LEBEDEV phosphate ester de NEUBERG	LEBEDEV dinitro ester de NEUBERG
6	8
18	38
30	20
20	10
10	—

TABLEAU VII.

Temps en minutes	LEBEDEV tampon glycogène	LEBEDEV dinitro glycogène
15	240	200
30	290	290
45	350	330
60	360	360

**VII. Influence des dinitros sur la phosphorolase.** Mesure du phosphate inorganique suivant KUTTNER et LICHTENSTEIN 22). Chaque tube contient: 0,7 ml. de suc de LEBEDEV dialysé, et respectivement 0,5 ml. de solution tampon (phosphate) de pH 7, ou de dinitrophénol 1.2.5 (concentration finale  $10^{-3}$  M). Ensuite 0,5 ml. de glycogène à 3,5% comme substrat.

De 15 en 15 minutes nous enlevons 0,05 ml. qui servent à la mesure du phosphate inorganique. Les résultats sont donnés en  $\gamma$  de phosphore inorganique estérifié (tableau VII).

**VIII. Influence des dinitros sur la disparition du phosphate inorganique.** Méthode de KUTTNER et LICHTENSTEIN.

Chaque tube contient 0,7 ml. de suc de LEBEDEV, et 0,7 ml. respectivement de phosphate primaire ou de dinitrophénol 1.2.5, (concentration  $10^{-3}$  M). Ensuite, 0,3 ml. de glucose (concentration finale M/20) ou de glycogène à 3,5%.

Sur les temps indiqués nous enlevons 0,05 ml., servant à la mesure du phosphate inorganique.

TABLEAU VIII A

temps en minutes	LEBEDEV phosphate glucose	LEBEDEV dinitro glucose
15	0	360
20	0	720
25	170	790
30	170	840
40	500	840
50	740	840

Les résultats sont donnés en  $\gamma$  de phosphore inorganique estérifié dans les temps donnés.

Le tableau VIII A donne les résultats avec le glucose comme substrat. Le tableau VIII B ceux avec le glycogène.

TABLEAU VIII B

temps en minutes	LEBEDEV phosphate glycogène	LEBEDEV dinitro glycogène
10	240	490
15	320	570
20	490	840

**IX. Inhibition de la glycolyse par le dinitrophénol.** Chaque appareil de WARBURG contient: 0,6 ml. de suc de LEBEDEV, et 1,1 ml. respectivement de phosphate primaire ou de dinitrophénol 1.2.5. Ensuite 0,3 ml. de glucose (concentration finale M/20).

Les résultats sont donnés en  $\text{mm}^3$  de  $\text{CO}_2$  de 10 en 10 minutes (tableau IX).

**X. Inhibition de la carboxylase par les dinitros.** Chaque appareil de WARBURG contient, 0,7 ml. de carboxylase et 0,7 ml. respectivement de phosphate primaire ou dérivé de dinitro. Ensuite: 0,3 ml. de pyruvate (concentration finale M/20).

Les résultats sont donnés en  $\text{mm}^3$  de  $\text{CO}_2$  libérés en 20 minutes (tableau X).

TABLEAU IX.

LEBEDEV phosphate glucose	LEBEDEV dinitro M/200 glucose	LEBEDEV dinitro M/2000 glucose
2	5	12
4	12	141
2	152	677
5	150	—
2	144	—
9	108	—
120	74	—
624	60	—

TABLEAU X.

	carboxylase phosphate pyruvate	carboxylase DNT $10^{-3}$ M pyruvate	carboxylase DNT $10^{-4}$ M pyruvate	carboxylase DNT $10^{-5}$ M pyruvate
dinitrophénol 2.5 . . . . .	172	8	22	106
	183	10	22	112
dinitrophénol 2.4 . . . . .	255	—	29	156
	223	—	56	129
dinitrophénol 2.6 . . . . .	214	164	193	198
	202	164	180	198
dinitrocrésol 4.6 . . . . .	143	20	119	141
	148	21	121	136
dinitro- $\alpha$ -naphtol 2.4 . . . . .	147	2	70	136
	140	4	60	134
dinitro-cyclopentyl-oxybenzol	161	2	37	156
	164	9	61	154
dinitrothymol 2.4 . . . . .	193	2	162	191
	153	16	109	141
dinitroguajacol 4.6 . . . . .	183	73	180	189
	218	107	180	191
mononitrophénol p. . . . .	170	148	159	162
	140	127	138	144
phénol . . . . .	160	127	150	160
	160	133	148	156

**XI. Inhibition de la carboxylase en aerobiose et anaerobiose.** Chaque appareil de WARBURG contient: 0,7 ml. de carboxylase et 0,7 ml. respectivement de phosphate primaire ou de dinitrophénol 1.2.5. Ensuite 0,3 ml. de glucose (concentration finale M/20).

Les expériences ont lieu en une atmosphère d'air ou d'azote purifié. Les résultats sont donnés en mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> libérés en 20 minutes (tableau XI).

TABLEAU XI.

Concentration finale du dinitrophénol	carboxylase phosphate pyruvate atmosphère:air	carboxylase dinitro pyruvate air	carboxylase dinitro pyruvate azote
10 <sup>-3</sup> M	294	22	14
10 <sup>-4</sup> M	205	42	33
2 × 10 <sup>-5</sup> M	173	84	50
10 <sup>-5</sup> M	181	110	73

**XII. Réversibilité de l'inhibition de la carboxylase.** Chaque appareil contient: 1,4 ml. d'un liquide qui se compose, soit de 0,7 ml. de carboxylase et de 0,7 ml. de phosphate primaire, soit de 0,7 ml. de carboxylase et de 0,7 ml. de dinitrophénol 1.2.5 (concentration finale 5 × 10<sup>-5</sup> M). Une partie de ce liquide a été dialysé avant l'emploi, l'autre ne l'a pas été. Ensuite il est ajouté 0,3 ml. de pyruvate (concentration finale M/20).

Les résultats sont donnés en mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> de 5 en 5 minutes pendant une demi heure (tableau XII)

TABLEAU XII.

carboxylase et phosphate dialysés pyruvate	carboxylase et dinitro dialysés pyruvate	carboxylase et phosphate non dialysés pyruvate	carboxylase et dinitro non dialysés pyruvate
9	10	48	15
7	14	48	12
8	16	40	9
16	18	35	5
14	12	24	5
16	14	26	2
70	84	221	48

**XIII. Influence du ph sur l'action des dinitros: phase d'induction.** Chaque appareil contient: 0,7 ml. de suc de LEBEDEV, et 0,7 ml. respectivement de solution tampon ou de dinitrophénol 1.2.5 (concentration finale 10<sup>-5</sup> M). Ensuite 0,3 ml. de glucose (concentration finale M/20). Nous prenons comme fin de la phase d'induction le moment de la mise en liberté des 300 premiers mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> (correspondant à peu près à 1 mgr. de glucose).

Le temps est exprimé en minutes (tableau XIII).

TABLEAU XIII

ph	LEBEDEV phosphate glucose	LEBEDEV dinitro glucose
3,9	50	10
4,5	50	15
5,0	65	30
6,0	75	35
6,9	110	60

**XIV. Influence du pH sur l'action des dinitros: inhibition de la carboxylase.** Chaque appareil contient: 0,7 ml. de carboxylase et 0,7 ml. respectivement de solution tampon phosphate ou dinitrophénol 1.2.5. Ensuite, 0,3 ml. de pyruvate (concentration finale M/20).

Les résultats sont donnés en mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> libérés en 20 minutes (tableau XIV).

TABLEAU XIV.

ph	carboxylase phosphate pyruvate	carboxylase DNP 10 <sup>-3</sup> M pyruvate	carboxylase DNP 10 <sup>-4</sup> M pyruvate	carboxylase DNP 10 <sup>-5</sup> M pyruvate
4,6	205	14	42	—
	172	10	22	106
6,6	169	26	117	164
	217	44	130	195

**XV. Inhibition de la carboxylase par le bleu de méthylène:** Chaque appareil contient: 0,7 ml. de carboxylase, et 0,7 ml. respectivement de phosphate primaire ou de bleu de méthylène (concentration finale 10<sup>-3</sup> M). Ensuite, 0,3 ml. de pyruvate (concentration finale M/20). Les expériences ont lieu en une atmosphère d'air ou d'azote purifié.

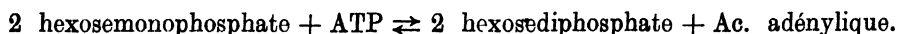
Les résultats sont donnés en mm<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> de 5 en 5 minutes pendant 20 minutes (tableau XV).

TABLEAU XV.

carboxylase phosphate pyruvate atmosphère : air	carboxylase bleu de méthylène pyruvate atmosphère : air	carboxylase bleu de méthylène pyruvate atmosphère:azote
106	42	46
60	20	37
60	18	35
38	10	28

### Résumé.

1°. L'augmentation de la vitesse de la respiration et de la fermentation des levures peut s'expliquer par l'activation de la réaction:



D'après nos expériences c'est à l'activation de cette réaction, qu'est imputable le raccourcissement de la période d'induction dans la fermentation du suc de LEBEDEV.

2°. L'inhibition est, au moins en partie, imputable à l'inactivation de la carboxylase.

3°. Grâce aux faits expérimentaux cités dans ce travail, on peut expliquer tous les faits observés concernant l'action des dinitros sur les cellules de levure.

Les dinitrodérivés nous furent prêtés aimablement par l'institut de Thérapie et de Pharmacologie du prof. HEYMANS.

L'adénosinetriphosphate nous fut gracieusement envoyé, comme sel de Ba par Dr. SÜLLMANN de Bâle, comme sel de Ca, par Dr. I. BANGA, à Szeged. A tous nos plus vifs remerciements.

Je prends un vif plaisir à remercier ici tout spécialement le Dr. L. MASSART. C'est sous sa direction et avec son aide si efficace, que ce travail a été porté à bonne fin.

- 1) H. Magne, A. Mayer, L. Plantefol, *Ann. de Physiol.* **7**, 269 (1981); **8**, 1 (1982). — 2) G. D. Greville, K. G. Stern, *Biochem. J.* **29**, 487 (1985). — 3) M. E. Krah, G. H. A. Clowes, *Jl. Amer. Chem. Soc.* **57**, 1144 (1985). — 4) J. Field, A. W. Martin, S. M. Field, *Proc. Soc. Exp. Biol.* **81**, 56 (1983); *Jl. of cell. compar. Physiol.* **4**, 405 (1984). — 5) E. Ehrenfest, E. Ronzoni, *Proc. Soc. Exp. Biol.* **81**, 318 (1983); *Jl. of Biol. Chem.* **115**, 749 (1986). — 6) A. Szent-Györgyi, *Studies on biological oxidation and some of its catalysts*, Leipzig, 1937. — 7) M. E. Krah, G. H. A. Clowes, *Proc. Soc. Exp. Biol.* **82**, 226 (1984). — 8) C. F. Cori, G. T. Cori, *Jl. of Biol. Chem.* **116**, 119 (1936). — 9) L. Genevois, R. Saric, *Soc. Biol.* **111**, 181 (1982); **117**, 386 (1984). — 10) K. Lohmann, *Bioch. Zs.* **237**, 470 (1981). — 11) H. v. Euler, *Zs. physiol. Chem.* **235**, 122 (1935). — 12) O. Warburg, *Bioch. Zs.* **254**, 438 (1982). — 13) O. Meyerhof, *Naturwiss.* **23**, 850 (1985). — 14) A. Schäffner, *Zs. physiol. Chem.* **234**, 146 (1935). — 15) H. Schumann, *Zs. exp. Med.* **105**, 14 (1939). — 16) O. Meyerhof, *Bioch. Zs.* **188**, 208 (1927). — 17) L. Plantefol, *Ann. de Physiol.* **8**, 127 (1982). — 18) C. S. Hanes, *Nature* **145**, 348 (1940). — 19) H. Wieland c.s., *Ann. Chem. (LIEBIG)* **499**, 213 (1932); **508**, 61, 70 (1933); **509**, 182 (1933). — 20) O. Meyerhof, W. Kiessling, *Bioch. Zs.* **267**, 341 (1933). — 21) L. Michaelis, V. Moragues-Gonzales, C. V. Smythe, *Enzymol.* **8**, 242 (1937). — 22) T. Kuttner, L. Lichtenstein, *Jl. of Biol. Chem.* **86**, 671 (1930).
-

# Über den Abbau der Bernsteinsäure vermittle Chinonkatalyse

## im Modell und seine Hemmung durch Dimedon

VON

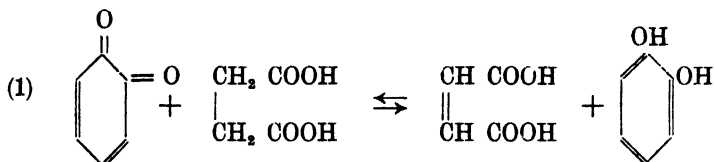
PETER MARQUARDT

(Pharmaz. Abt. der Byk-Guldenwerke, Oranienburg bei Berlin).

Mit 2 Figuren im Text.

(25.II.41.)

In einer früheren Mitteilung ist ein Modell beschrieben worden <sup>1)</sup>, in dem der Abbau der Bernsteinsäure zu Acetaldehyd ohne Fermente aus Geweben und ohne zellfreie Gewebsextrakte nur unter Zusatz von Adrenalin, also durch Chinonkatalyse, wahrscheinlich gemacht wurde \*). Damals wurden u.a. Ansätze betrachtet, die 2 g Adrenalin in 200 cem 1 %iger Bernsteinsäure enthielten. In einem von diesen Kolben war zum Abfangen des aus der Bernsteinsäure entstehenden Acetaldehyds nach NEUBERG <sup>2)</sup> Dimedon hinzugesetzt. Bei der Betrachtung fiel auf, dass der Kolben mit Dimedon zu einer Zeit eine orangefarbige Färbung aufwies, in der der Inhalt des anderen eigentlich nur noch als schwarz zu bezeichnen war. Dieser Farbunterschied wurde bereits so gedeutet, dass die Oxydation auf der Stufe des Adrenochroms dadurch länger verweilte, dass der Acetaldehyd, das reaktionsfreudige Endprodukt der Abbaureihe der Bernsteinsäure, durch Dimedon abgefangen wurde. Es erscheint nun wesentlich, festzustellen, ob eine derartige Lösung noch blutdruckwirksam ist. Nach der in der ersten Mitteilung angegebenen Formel (1) für die erste Reaktion der Abbaukette wäre diese Wirkung zu fordern.



(Der Einfachheit halber wurde in der Formel die Seitenkette des Adrenalins weggelassen).

Die Blutdruckwirkung einer solchen Lösung kann also darüber hinaus indirekt das Fehlen des Acetaldehyds beweisen, denn es ist bekannt, dass Acetaldehyd Adrenalin in hohem Masse inaktiviert (RICO und BAPTISTA <sup>7)</sup>, BAYER und WENSE <sup>8)</sup>). WENSE <sup>9)</sup> führte anhand der Luminolreaktion diese Oxydationsbeschleunigung des Adrenalins (denn um eine solche handelt es sich bei der Wirkung des Acetaldehyds) auf das Auftreten eines Peroxydes bei längerem Stehen zurück. Da nun dem Acetaldehyd eine besondere Aktivität in der Adrenalinzerstörung zugeschrieben werden muss, so muss nach Abfangen des Acetaldehyds in der verfärbten Lösung noch eine pharmakologische Wirkung vorhanden sein, da beim ungehemmten Ablauf der Reaktion zwischen Adrenalin und Bernsteinsäure (also ohne Dimedon), wie auch schon die Farbe erkennen lässt, der Verlauf ein wesentlich anderer ist; eine Wirkung der braunschwarzen Lösung (ohne Dimedon) ist nicht zu erwarten und war auch experimentell nicht zu finden.

Wenn man diesen Gedanken kurz zusammenfasst, so ergibt sich, dass der Acetaldehyd Adrenalin stark zu inaktivieren vermag. Weiter ergibt sich aus meinen Untersuchungen, dass man, wenn man die Farbe von Adrenalinlösungen in Bernsteinsäure betrachtet, eine erhebliche Verzögerung der Verfärbung erhält, wenn man der Lösung ein Mittel (Dimedon) zusetzt, das den

\*) Die Beschleunigung der Oxydation des Adrenalins durch C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren, vorzüglich Bernsteinsäure und Fumarsäure, wurde von mir mehrmals beschrieben (3, 4, 5, 6).

Acetaldehyd abfängt. Daraus kann indirekt geschlossen werden, dass das Abfangen des Acetaldehyds weitgehend gelungen ist, wenn einer solchen verfärbten Lösung noch eine Blutdruckwirkung zukommt.

Zur Prüfung wurde folgender Versuch unternommen (Fig. 1):

Ansatz vom 31.3.1939, beobachtet am 21.10.1939 (also nach sieben Monaten). Die Lösung weist eine orangefarbene Verfärbung auf. Es wurde eine Menge injiziert, die 100  $\gamma$  Adrenalin entspricht.

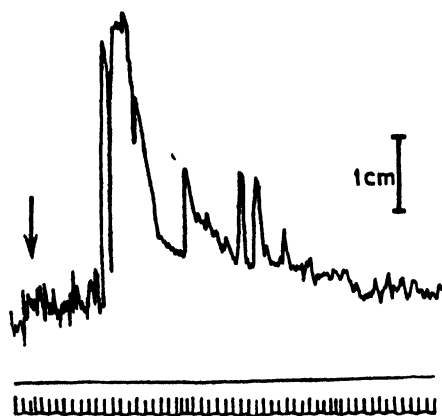


Fig. 1. Karotisblutdruckversuch am Kaninchen. Hg-Manometer, Aethernarkose. Zeitschreibung 10 sek.



Fig. 2. Karotisblutdruckversuch. Kaninchen 3,5 kg, Urethannarkose; 9 mg Atropin Hg-Manometer, Zeitschreibung: 4 Sek. Injektion einer Menge der beschriebenen Lösung entsprechend 50  $\gamma$  Adrenalin des Ansatzes.

Es zeigt sich in dem Versuch, dass die Blutdruckwirksamkeit in hohem Masse erhalten geblieben ist.

Dieser Versuch wurde mit einer Lösung von 0,5 g Adrenalin und 0,6 g Dimedon in 20 ccm 1 %-iger Bernsteinsäure (angesetzt am 11.9.1939) wiederholt. Die Lösung wurde am 20.12.39 und am 27.1.41 filtriert und ohne jede Vorsichtsmassnahme im Laboratorium aufgehoben. Sie stellte sich innerhalb eines Vierteljahres auf eine konstante blutrote Farbe ein, die bis zum heutigen Tage (1.2.1941 = fast 1½ Jahre) erhalten blieb. Schon die Farbe beweist, dass hier eine konstante Gleichgewichtslage zwischen Adrenalin und Adrenochrom vorliegt, wie sie auf eine andere Art (z.B. Stabilisierung mit Ascorbinsäure) in dieser Konstanz bisher nicht zu erzielen ist. Die erhebliche Blutdruckwirksamkeit (siehe Fig. 2) kann daher nicht überraschen. (Das cholinerge Nervensystem wurde durch Atropin ausgeschaltet).

Da in beiden Versuchen die Blutdruckwirkung erhalten blieb, so können diese Versuche im Sinne der vorgetragenen Ansicht indirekt als weitere Bestätigung der früher (1) mitgeteilten Befunde gelten. Die Stabilität der Farbe in der Lösung kann im gleichen Sinne gedeutet werden, nämlich dass das Abfangen des Acetaldehyds gelungen ist.

1) P. Marquardt, *Enzymol.*, **6**, 325 (1939). — 2) C. Neuberg, in C. Oppenheimer-L. Pincussen, *Methodik der Fermente*, Leipzig 1929. — 3) P. Marquardt, *Klin. Woch.* **17**, 1445 (1938). — 4) id. *Klin. Woch.* **18**, 252 (1939). — 5) id., *Klin. Woch.* **18**, 287 (1939). — 6) id., *Zs. exp. Medizin* **107**, 179 (1940). — 7) Toscano Rico, Malafaja Baptista, *Soc. Biol.* **118**, 1118 (1935). — 8) G. Bayer, Th. Wense, *Arch. für exp. Path.* **188**, 114 (1937). — 9) Th. Wense, *Zs. physiol. Chem.* **260**, 100 (1939).

# Some properties of crystalline papain:

## Stability toward heat, ph and urea; ph optimum with casein as substrate \*) \*\*)

BY

HANS LINEWEAVER \*\*\*) AND SIGMUND SCHWIMMER

(*Enzyme Res. Labor., Bureau of Agr. Chem. and Eng., U.S.D.A.*)

With 5 figures.

(20.II.41.)

This paper describes certain properties of crystalline papain (BALLS and LINEWEAVER <sup>1)</sup>) that have been encountered in connection with the investigations of that substrate in this Laboratory.

### Materials and methods.

The hemoglobin substrate used in the stability studies was prepared as described by ANSON <sup>2)</sup> The casein substrate used in the ph optimum studies was prepared from HAMMARSTEN's casein by solution in dilute alkali (ph = 8) and by heating the solution at 90° for about 30 minutes. The solution was then cooled, diluted, and adjusted to the experimental conditions desired. Urea was used as a solvent aid in the cases indicated.

The crystalline enzyme was that of BALLS and LINEWEAVER <sup>1)</sup>. The latex enzyme was a fresh water or salt extract of undried latex that had been collected, canned, shipped by air mail from Hawaii, and then stored at 0° C. until needed. The high salt fraction enzyme was the residual enzyme (more soluble protein) material from which crystalline papain had been prepared.

Activation, using cyanide, was carried out essentially as described by ANSON <sup>2)</sup> and by BALLS and LINEWEAVER.

The method described by ANSON was used in determining the amount of hemoglobin substrate made soluble in trichloroacetic acid by the enzyme (see also BALLS and LINEWEAVER). The formol titration method employed is essentially that described by NORTHROP and NORTHROP and KUNITZ <sup>3)</sup>. The milk-clotting method described by BALLS and HOOVER <sup>4)</sup> had been used as adapted by BALLS and LINEWEAVER.

### Experimental results.

**ph Stability of Crystalline Papain** — KRAUT and BAUER <sup>5)</sup> report the stability optimum of a papain solution to be in the range of ph from 5 to 6. The data reported in Fig. 1, which confirm those authors, also show that crystalline papain is not rapidly inactivated at 90° between ph 8 and 12. However, the enzyme is rapidly inactivated near ph 2 and 13. No data have been obtained on the stability of papain in the presence of various activators and impurities such as metals and oxidizing agents. The kinetics of inactivation are complicated by some factors unknown at present. For example, it may be noted (Fig. 1) that the per cent inactivation for the first 15 minutes is unexpectedly large compared to the per cent inactivation occurring during the next 105 minutes. From these data it is not possible to choose between several more or less obvious explanations including the possible presence of two or more proteins having papain activity. The broad limits of the ph stability are, however, fairly definite.

The lower limit of stability indicates that crystalline papain is of little value as an anthelmintic if it has to first pass through a stomach whose ph is below 2.3. Although crystalline

\*) Enzyme Research Laboratory Contribution No. 68.

\*\*) This work was done under Special Research Fund No. SRF-2-9 provided by the Bankhead-Jones Act.

\*\*\*) Now with the Western Regional Laboratory, Albany, California.



papain will digest *Ascaris lumbricoides in vitro*, as shown by BERGER and ASENJO<sup>6)</sup>, it is doubtful if it will survive the acidity and other destructive agents that may be in the gastric juice. This conclusion is similar to that of KUITUNEN-EKBAUM<sup>7)</sup> with regard to the anthelmintic activity of pineapple juice. He showed that gastric juice or 0.2 per cent HCl destroys the *in vitro* worm digestive effect (bromelin) of the juice and that oral administrations to living animals were ineffective in three cases. TASHIRO and SCHMIDT<sup>8)</sup> state that, „it (papain) is harmless to peptic digestion as the optimum conditions of peptic digestion destroy papain”.\*)

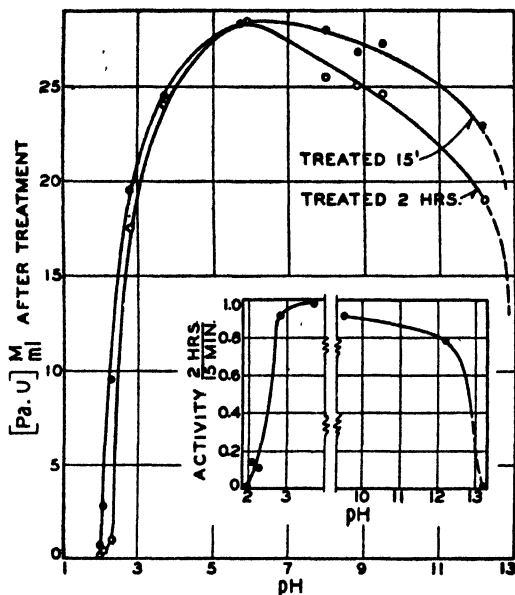


FIGURE 1

The pH stability of crystalline papain at 30°. The inset gives the ratios of the milk-clotting activities after standing at the pH values indicated for 2 hours and for 15 minutes. The main figure gives the units of activity remaining after the times indicated. The pH of the dialyzed enzyme solution used for these experiments was 5.8. Cyanide was used as activator after the samples had been returned to pH  $6.0 \pm 0.5$ . The pHs were determined with a glass electrode except for pH 13.2 which was calculated.

The data here reported confirm the reports of the authors who claim that the optimum pH for the digestion of casein by papain is near pH 7. The initial rate of digestion of casein as measured by the formol titration is shown in Fig. 2. A further refutation of the concept that the pH optimum of proteolysis by papain coincides with the isoelectric point of the substrate is given by the fact that the optimum using egg albumin is on the alkaline side of the isoelectric

**The pH Optimum of Papain (on casein)** — WILLSTÄTTER and GRASSMANN<sup>9)</sup> and WILLSTÄTTER, GRASSMANN and AMBROS<sup>10)</sup> working with fibrin, albumin, peptone and gelatin concluded that the pH optimum of papain coincided with the isoelectric point of the substrate. Since that time a number of workers, apparently without further test, have used the isoelectric points of the substrate (protein) when studying the action of papain. For example, SVEDBERG and ERIKSON<sup>11)</sup>, and ANNETTS<sup>12)</sup> used pH 5 for a study of the digestion of egg albumin; LEIPERT and HÄFNER<sup>13)</sup> used pH 5 for a study of casein digestion; BALLS, SWENSON and STUART<sup>14)</sup> measured casein digestion at pH 4.7 pl.m. 0.1 and JÖRGENSEN<sup>15)</sup> measured the increase of soluble nitrogen formed from casein at pH 4.62. On the other hand, FABRE<sup>16)</sup> has indicated that the pH optimum for casein digestion is near pH 7, and SATO<sup>17)</sup> reported an optimum of 6.5. ANSON<sup>2)</sup> in reporting a method for the assay of papain stated that papain like trypsin digested such proteins as hemoglobin and casein most rapidly in slightly alkaline solution. WILLSTÄTTER and GRASSMANN<sup>9)</sup> themselves had proposed the isoelectric point theory with the knowledge that observationally the optimum for casein \*\*) was on the alkaline side of the isoelectric point.

\*) Raw papaya latex has, however, recently been found in this laboratory (unpub. data of BALLS and JANSEN) to contain a proteolytic enzyme more resistant to acid than the crystalline papain studied here.

\*\*) WILLSTÄTTER and GRASSMANN<sup>9)</sup> p. 188. „So kann auf dem Substrat in alkalischem Medium eine viel grössere Konzentration des Enzyms hergestellt und die geringere Reaktionsgeschwindigkeit bei alkalischer Reaktion dadurch überdeckt sein.”

point of egg albumin \*). GREENBERG and WINNICK<sup>18</sup>) have determined a more complete ph optimum curve for papain acting on denatured egg albumin and find the optimum to be near ph 7.0 \*). We observed that the digestion of heat denatured egg albumin (prepared from a 8-times crystallized sample) at ph 4.5 and 7.1 gave a rate at the high ph several fold greater than at the low ph. The rate of formation of non-protein material that would yield a color with the tyrosine phenol reagent was determined. Essentially, the substrate consisted of 1.7% protein, M/15 phosphate and 85% urea.

Tests with the materials used in this investigation showed that casein in 40% urea at 30° C. is stable at ph 5 to 6 for at least 28 hours; and that the enzyme preparations used had no urease action and were not sensitive to 0.1 M citrate at ph 5.4, to 0.1 M phosphate at 8.0, or to caprylic alcohol.

The rate of digestion of gelatin at ph 4.0 or 6.4 (citrate buffer) was observed to be only about 60% of the rate at 5.2. This is in agreement with WILLSTÄTTER and GRASSMANN<sup>9</sup>) whose data show a ph optimum of 5 for gelatin digestion by papain.

**Thermostability of Crystalline Papain** — UNDERRAIN<sup>19</sup>) reports that 15 minutes at 60° hardly affects the activity of a papain solution, but one minute boiling inactivates it completely. HARLEY (see OPPENHEIMER<sup>20</sup>)) states that papain is weakened at 75° and destroyed at 82.5° C. These results are essentially applicable to crystalline papain also where loss of activity is observed first near 70°.

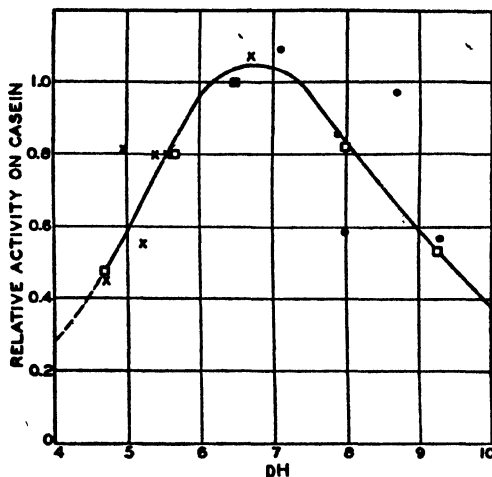


FIGURE 2

ph Optimum of casein digestion by crystalline and commercial papain. The data from experiments run at various times were multiplied by suitable factors so that they would superimpose at or near ph 6.5. The crosses and circles represent crystalline papain with and without urea respectively; the squares represent commercial papain with urea. The formol titration method of assay was used.

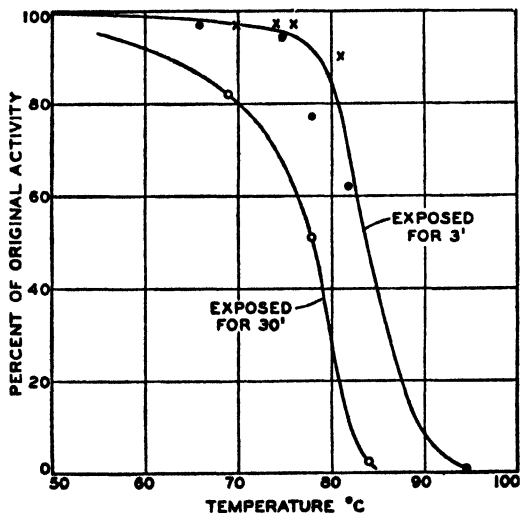


FIGURE 3

Heat inactivation of crystalline papain in solution. The solid circles (●) represent data obtained by the first method (see text) and the crosses (x) and open circles by the second method.

\*) These results, which reflect initial breakdown of the protein, do not necessarily conflict with the results of WILLSTÄTTER, GRASSMANN and AMBROS<sup>10</sup>) (p. 311), since their results show that papain hydrolyses egg albumin peptone most rapidly near ph 5.

crude papain. Both the temperature range and the critical thermal increments (48,000 in this case) are comparable.

**Method.** The first method used to expose the enzyme solutions was as follows: 0.1 ml. samples of enzyme were exposed in  $10 \times 50$  mm test tubes to various temperatures for 3 minutes. At the end of 3 minutes four drops of cold water were added, the enzyme was activated with cyanide and the whole sample was assayed by the milk-clotting technique in 5 to 6 minutes. The second method, which gave similar results, differed in that 1 ml. of water at the desired temperature was added to the tube (containing 0.1 ml. of enzyme solution) at the time of immersion in the water bath, and finally 1 ml. of cold water was added when the tube was removed. One-half ml. of the resulting solution was then activated and assayed as before. Tests showed that it required about 30 seconds to approach the bath temperature within  $3^\circ$  and about 1 to  $1\frac{1}{2}$  minutes to approach it within  $1/2^\circ$ . The cooling technique lowered the temperature below  $60^\circ$  in less than 15 seconds. Hence although

the results should be comparable they are somewhat arbitrary in an absolute sense. The 30 minute exposures were also made by this technique.

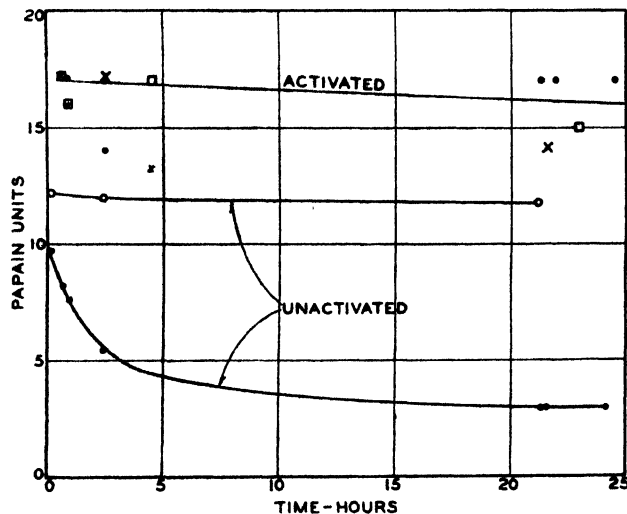


FIGURE 4

The activity of papain as a function of the time of standing in 9 M urea at pH 6 and  $30^\circ\text{C}$ . The open circles (o) and crosses (x) represent the milk-clotting activity remaining in a water solution of papain; the other points represent papain activity remaining in a 9 M urea solution after standing for the times indicated; the squares (□) represent  $[\text{Pa. u.}] \text{Hb/mg P.N.} \times 10^3$  (4) (Hb activity figures for the stability of papain in water are not reported although many tests incidental to other experiments show that it is stable for many hours); the solid circles (●) represent  $[\text{Pa. u.}] \text{M/mg P.N.}$  (4).

WEAVER and HOOVER<sup>22</sup>). However, it is not implied that other proteolytic enzymes may not also be essentially stable to urea. For example, STEINHARDT<sup>23</sup>) has shown that pepsin is stable in 4 M urea while KUNITZ<sup>24</sup>) has shown that chymotrypsin is rapidly inactivated even in 2 M urea. It is reasonable, of course, to expect that there will be as great a variation in the behavior of enzyme proteins in urea solutions as among proteins in general.

**Extent of Digestion by Papain.** — LEIPERT and HÄFNER<sup>13</sup>) in studying the liberation of tyrosine and tryptophane from casein found that about 47% of the total nitrogen was liberated as aminonitrogen and that about 60% of the total nitrogen became soluble in phosphotungstic acid after 12 days. The corresponding percentage for one day's digestion was 40% for both tests. It is noteworthy that the increases in amino nitrogen, soluble nitrogen, tyrosine, and tryptophane nitrogen did not parallel. Subsequent digestion by trypsin increased the amino-N to 71% of the total N (this corresponds to practically 100% hydrolysis of the peptide bonds). SVEDEBERG and ERIKSON<sup>11</sup>) and ANNETTS<sup>12</sup>) have analyzed the products of the action of papain on egg

### Stability of Papain in Urea Solutions.

— Fig. 4 shows that a dialysed solution of crystalline papain at  $30^\circ\text{C}$ ., pH 6.5, pl.m. 0.5, and in the absence of activator, is remarkably stable in 9 M urea solution (50% by weight). There is practically no irreversible loss of activity in 24 hours. Although there is a reversible loss of activity if the sample is not activated before assay, it is doubtful that this represents reversible protein denaturation. This conclusion is supported by the observation that the nitroprusside test, which is positive for heat, acid, and alkali denatured papain, remains negative even in the presence of added cyanide.

The stability of papain to urea has made it useful in studying the effect of urea on the digestibility of proteins (LINE-

albumin. It appears from their results also that hydrolysis to amino acids is not complete, the smallest particles having an average molecular weight of several hundred 12).

The data reported here show that the extent of digestion of casein with crystalline papain is not greatly different than with unpurified papain. Fig. 5 (curves 7 and 8 for crystalline papain) shows a maximum titer per 0.08 gm. of casein of about 7 to 7.5 ml of N/50 NaOH corresponding to 22 to 28% hydrolysis assuming that 31.5 ml \*) corresponds to complete hydrolysis. Curves 10, 11 and 12 for the latex enzyme show a maximum titer of about 7.5 to 8 ml corresponding to 23 to 25% hydrolysis. These percentage figures probably should be increased by 2 or 3% since the formol titration technique used gives values that are slightly low in an absolute sense.

The data of LEIPERT and HÄFNER <sup>13</sup>) on casein and of CALVERY <sup>25</sup>) on egg albumin show more than 60% hydrolysis of peptide bonds by papain, about three times the figure obtained in this study. Although it has not been possible to investigate these differences experimentally at this time, it should be noted that the major difference in the tech-

\*) This figure is calculated assuming that the average residue weight of amino acids in casein is 127. Hence  $(80 \text{ mg. casein})/127 = 0.63 \text{ meq. per sample}$ ;  $0.63/0.02 = 31.5 \text{ ml}$  maximum calculated titer per sample.

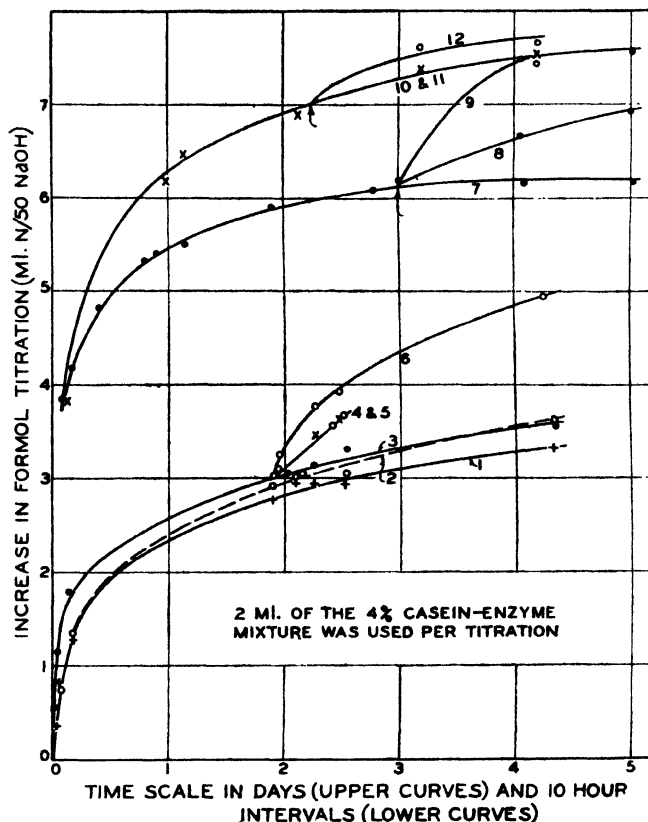


FIGURE 5

Digestion of casein by crude and crystalline papain at pH 7.9 to 7.3. The upper and lower sets of curves are for different enzyme concentrations as well as for different times.

- Curve 1 — Latex enzyme (about 0.003 mg. N/ml).
- Curve 2 — Enzyme from the high salt fraction.
- Curve 3 — 0.0028 mg. of crystalline enzyme N/ml.
- Curve 4 — Fresh crystalline enzyme was added to No. 3 yielding a total concentration of 0.0053 mg. N/ml.
- Curve 5 — Fresh latex enzyme was added to No. 3 yielding the same concentration of this crude enzyme, in addition to the crystalline enzyme, as exists in No. 1.
- Curve 6 — Fresh high salt fraction enzyme was added to No. 3 yielding the same concentration as in No. 2.
- Curve 7 — 0.034 mg of crystalline enzyme N/ml.
- Curve 8 — Fresh crystalline enzyme was added to No. 7 yielding 0.068 mg N/ml.
- Curve 9 — Fresh latex enzyme was added to No. 7 yielding the same concentration as in No. 10.
- Curve 10 — Latex enzyme, about 12 times the concentration of No. 1 (0.035 mg N/ml).
- Curve 11 — Fresh crystalline enzyme was added to No. 10 yielding the same concentration as in No. 7.
- Curve 12 — Fresh latex enzyme was added to No. 10 to give a total concentration of 0.077 mg N/ml.

niques lies in the pH value at which hydrolysis was carried out. The literature on papain indicates that the pH of 5, used by the earlier workers, should favor the „*peptidase*” action as compared with pH 7. For example, WILLSTÄTTER, GRASSMANN and AMBROS<sup>10)</sup> found a pH optimum of about 5 for an egg albumin peptone substrate. Whatever the explanation may be, it is evident that no marked difference in extent of digestion by the latex and the crystalline enzyme occurs under these conditions. A difference between the time course of digestion by the crystalline and non-crystalline enzyme, however, may be noted by comparing curves 1 and 2 with curve 8. It is seen that the initial rate of hydrolysis by the crystalline enzyme is more than twice that for either of the other enzyme samples, whereas after an increase in titration of 2 ml has been reached the rates for all three enzymes are the same within about 20%. It is thus evident that the curves do not superimpose and hence we are doubtless dealing with different enzymes or enzyme mixtures. It is remarkable that curves 10 and 12 are only slightly higher than 7 and 8.

### Summary.

1. At 30° C and in the absence of activator crystalline papain has been found to be rapidly inactivated below pH 2.5 to 3 and above pH 12. The stability optimum lies in the pH range of 5 to 7.

2. The pH optimum for proteolysis of denatured casein is 6.5 to 7. Also proteolysis in the region of pH 7 is much greater than in the region of pH 5 for both denatured egg albumin and denatured hemoglobin.

3. Crystalline papain is stable for 24 hours at 30° C in 9 M urea solution. No -SH (nitroprusside test) appeared even in the presence of cyanide.

4. It is rapidly denatured (as indicated by the appearance of -SH) and is half inactivated in 3 minutes at 82 to 85° C.

5. The time course of hydrolysis of casein confirms previous indications that crystalline papain does not represent the total proteolytic activity of papaya latex.

6. At pH 7 and 30° C about 25% of the calculated number of peptide bonds of casein were hydrolyzed (formol titration) by both latex and crystalline enzyme. This figure is lower than that of earlier workers.

- 1) A. K. Balls, H. Lineweaver, *Jl. of Biol. Chem.* **180**, 669 (1939). — 2) M. L. Anson, *Jl. of gen. Phys.* **20**, 561 (1937); **22**, 79 (1938). — 3) J. H. Northrop, *Jl. of gen. Phys.* **16**, 41 (1932); J. H. Northrop, M. Kunitz, *ibid.* **16**, 313 (1932). — 4) A. K. Balls, S. R. Hoover, *Jl. of Biol. Chem.* **121**, 737 (1937). — 5) H. Kraut, E. Bauer, *Zs. physiol. Chem.* **164**, 10 (1927). — 6) J. Berger, C. F. Asenjo, *Sci.* **91**, 387 (1940). — 7) E. Kuitunen-Ekbaum, *Sci.* **91**, 240 (1940). — 8) S. Tashiro, L. H. Schmidt, *Amer. Jl. Phys.* **119**, 413 (1937). — 9) R. Willstätter, W. Grassmann, *Zs. physiol. Chem.* **138**, 184 (1924). — 10) R. Willstätter, W. Grassmann, O. Ambros, *ibid.* **151**, 307 (1926). — 11) T. Svedberg, I. Erikson, *Bioch. Zs.* **258**, 1 (1933); *Jl. Amer. Chem. Soc.* **56**, 409 (1934). — 12) M. Annetts, *Biochem. Jl.* **80**, 1807 (1936). — 13) T. Leipert, I. Häfner, *Bioch. Zs.* **229**, 427 (1930). — 14) A. K. Balls, T. L. Swenson, L. S. Stuart, *Jl. Assoc. Off. Agr. Chem.* **18**, 140 (1935). — 15) H. Jörgensen, *Bioch. Zs.* **280**, 1 (1935). — 16) R. Fabre, R. Frossard, *Soc. Biol.* **92**, 59 (1925). — 17) M. Sato, *Jl. Faculty Agr. Hokkaido Imp. Univ.* **24**, 101 (1929); *Chem. Abstr.* **24**, 390 (1930). — 18) D. M. Greenberg, T. Winnick, *Jl. of Biol. Chem.* **135**, 775 (1940). — 19) A. Underrain, *Milchw. Forsch.* **15**, 433 (1933). — 20) C. Oppenheimer, *Die Fermente und ihre Wirkungen*, 5. Ed. II, p. 1102 (1926). — 21) T. Winnick, A. R. Davis, D. M. Greenberg, *Jl. of gen. Phys.* **23**, 301 (1940). — 22) H. Lineweaver, S. R. Hoover, *Jl. of Biol. Chem.* **137**, 325 (1941). — 23) J. Steinhardt, *Jl. of Biol. Chem.* **123**, 543 (1938). — 24) M. Kunitz, *Jl. of gen. Phys.* **22**, 207 (1938). — 25) H. O. Calvery, *Jl. of Biol. Chem.* **102**, 73 (1933).

# La détection histochimique et le microdosage des acides pentosenucléiques

(tissus animaux – développement embryonnaire des amphibiens)

PAR

J. BRACHET

(Lab. de Morphol. animale, Fac. des Sci. de l'Univ. de Bruxelles)

Avec 1 figure.

(22.II.40.)

## 1. La détection histochimique des acides pentosenucléiques.

Nous avons décrit récemment (1) une technique permettant la détection facile et rapide des acides pentosenucléiques dans une préparation microscopique: cette méthode consiste à traiter les coupes par la ribonucléase, ferment capable d'attaquer spécifiquement l'acide pentosenucléique (DUBOS c.s. 2, 3), SCHMIDT et LEVENE<sup>4</sup>), KUNITZ<sup>5</sup>). Si on colore ensuite la préparation par un colorant basique, on observe une disparition de la basophilie lorsque cette dernière est due à la présence d'acide ribonucléique; les résultats les meilleurs s'obtiennent par une coloration au vert de méthyle-pyronine suivant UNNA-PAPPENHEIM: la pyronine se fixe en effet avec intensité sur les pentosenucléoprotéides, après la plupart des fixations. Les propriétés curieuses de la ribonucléase (thermostabilité en milieu légèrement acide, solubilité dans l'acétone à 50%, optimum au voisinage de 70°) se prêtent favorablement à son isolement. On peut préparer des extraits actifs soit par la méthode de DUBOS et MAC LEOD<sup>2</sup>), soit par celle de DUBOS et THOMPSON<sup>3</sup>); l'obligeance du Dr. KUNITZ, à qui vont tous nos remerciements, nous a valu le privilège de pouvoir essayer un échantillon de ribonucléase recristallisée à six reprises. Toutes ces préparations ont donné des résultats identiques, tant en ce qui concerne leur action sur l'acide zymonucléique que celle sur les coupes histologiques. Des extraits suffisamment actifs s'obtiennent aisément en traitant le pancréas de boeuf finement broyé par 1-2 volumes d'acide acétique 0.1 N pendant 12 heures; on fait alors bouillir 10', on filtre et neutralise le filtrat. On refiltre et dialyse pendant 24 heures le liquide obtenu. On se débarrasse du précipité par centrifugation et on a la solution utile; celle-ci, conservée à la glacière, perd progressivement de son activité.

La ribonucléase, comme l'ont montré DUBOS et THOMPSON<sup>3</sup>), n'exerce aucune action constatable sur différentes protéines, la peptone, les glycoprotéides, les polysaccharides, les esters phosphoriques des glucides, les lipides, l'acide thymonucléique. Nous avons jugé bon de vérifier que ce ferment n'attaque pas non plus la caséine, les phosphoprotéides pouvant se trouver dans certains tissus animaux en quantités notables; le caractère fortement acide de ces substances risquait de leur conférer une nette basophilie. Les résultats ont été entièrement négatifs: au cours de l'action de la ribonucléase sur la caséine, il ne se libère en effet pas de P, même sous forme organique.

L'emploi de la ribonucléase a permis de retrouver sur coupes certaines des observations faites *in vitro* par DUBOS et THOMPSON: l'acide thymonucléique, le cartilage, ne présentent aucune diminution de leur basophilie après la digestion (1 h. à 65°); il en va de même pour des concrétions d'acide urique que l'on rencontre chez les Insectes. Le glycogène ne correspond certainement pas non plus aux granules colorables par la pyronine: les jeunes oocytes d'Amphibiens, par exemple, prennent vivement la pyronine alors qu'ils ne donnent pas les réactions histochimiques du glycogène. Notons cependant à ce sujet qu'il a été signalé (STÜBEL<sup>6</sup>)) qu'un traitement prolongé par la salive fait disparaître la colorabilité par la pyronine: différents essais nous ont montré que ce résultat est dû, non à la présence de l'amylase, mais à celle de la ribonu-

oléase qui se trouve en petites quantités dans la salive. Enfin, le mucus prend le vert de méthyle et non la pyronine; la coloration verte ne disparaît d'ailleurs pas par traitement à la ribonucléase.

Sans nous étendre sur les résultats obtenus qui seront publiés en détail ailleurs (Arch. de Biol.), signalons que les acides pentosenucléiques se rencontrent, en proportions variables, chez toutes les espèces étudiées. Chez les Vertébrés, on les trouve surtout dans le cytoplasme des cellules glandulaires (pancréas, foie, glandes salivaires, glandes de LIEBERKÜHN, cellules principales des glandes de l'estomac) et dans la peau. C'est aussi à la présence d'acide pentosenucléique que les blocs de NISSL doivent leur basophilie. Chez les Invertébrés, on trouve une accumulation de ces substances dans le cytoplasme des glandes salivaires des Diptères, l'intestin et les cellules imaginaires des larves de Drosophiles, les tissus de Planaires en voie de régénération. Le macronucléus des Infusoires, la vultine des levures, renferment des acides pentose nucléiques en abondance. Ces substances se rencontrent d'ailleurs aussi dans le noyau: les nucléoles des cellules les plus variées perdent leur basophilie lorsqu'on a fait agir la ribonucléase. Ce ferment modifie également la colorabilité de la chromatine vis à vis du mélange de UNNA: alors qu'elle prend normalement les deux colorants basiques qui constituent le mélange, elle ne fixe plus que le vert de méthyle après la digestion; il semblerait donc que la chromatine contienne de petites quantités d'acides pentosenucléiques qui détermineraient l'affinité du noyau pour la pyronine. Cette affinité paraît encore accrue lors de la division cellulaire. Ces résultats confirment, tout en les élargissant considérablement, les constatations faites par CASPERSSON et SCHULTZ <sup>7)</sup> par une méthode toute différente (photographie dans l'U.V.) nécessitant d'ailleurs un outillage complexe et coûteux.

Les données fournies par la méthode histochimique concordent bien aussi avec ce que l'on sait de la teneur en acides pentosenucléiques des différents organes et cellules: à cet égard, la richesse du pancréas, de la levure, est bien connue. JORPES <sup>8, 9)</sup> a établi que le pancréas exocrine est beaucoup plus riche en pentoses que la portion endocrine: ce résultat se retrouve sur coupes où les îlots de LANGERHANS apparaissent en clair. La diminution de la teneur en pentoses signalée par JORPES <sup>9)</sup> au cours de la spermatogénèse se retrouve également par la méthode histochimique. Enfin, la richesse en acides ribonucléiques des oeufs d'Oursin (J. BRACHET <sup>10, 11)</sup>, des embryons de Truite (VAN DER GHINST <sup>12)</sup>) et d'Oiseaux (MENDEL et LEAVENWORTH <sup>13)</sup>) va de pair avec une vive affinité pour la pyronine.

Une comparaison précise entre la teneur en pentoses des différents organes, voire de certaines cellules d'un même organe, et leur basophilie présenterait un intérêt manifeste; les indications recueillies dans la littérature (GRUND <sup>14)</sup>, BENDIX et EBSTEIN <sup>15)</sup>, JORPES <sup>9)</sup>) ne sont malheureusement guère utilisables: les techniques employées ne reposent généralement pas sur des bases sûres et quelques causes d'erreurs, qui seront exposées plus loin, n'ont pas été remarquées. En outre, ces méthodes exigent plusieurs grammes de tissu et elles ne permettent évidemment pas d'aborder nombre de problèmes intéressants. Il convenait donc de chercher à améliorer les techniques existantes et à augmenter leur sensibilité si on voulait rendre fructueuse une comparaison entre la teneur en pentoses des tissus et leur basophilie.

## 2. Microdosage des pentosenucléoprotéides.

Deux types de méthodes ont été proposés récemment pour le dosage des pentoses dans les tissus animaux: modification de la réaction de BIAL à l'orcine (DISCHE et SCHWARTZ <sup>16)</sup>, MEJBAUM <sup>17)</sup>) ou hydrolyse acide et entraînement par la vapeur du furfurol formé (HOFFMANN <sup>18)</sup>, SUMINOKURA <sup>19)</sup>, PARNAS et UMSCHWEIF <sup>20)</sup>, BAILEY <sup>21)</sup>). La première de ces méthodes, tentante par sa simplicité, n'a été utilisée que sur des extraits trichloracétiques d'organes; de nombreuses tentatives nous ont montré qu'elle ne peut être appliquée aux nucléoprotéides en raison des difficultés que l'on éprouve à réaliser une hydrolyse complète; les produits d'hydrolyse des protéines interfèrent d'ailleurs avec la coloration verte qui se développe. Cette réaction n'a

donc d'autre portée que de déceler les pentoses qualitativement; notons que le glucose, comme l'a signalé MEJBAUM, donne une réaction positive. De plus, le glycogène gênant lui aussi la réaction, le dosage des pentoses acidosolubles (nucléotides) se heurte à de grosses difficultés lorsqu'on traite des tissus où ce polysaccharide est abondant (foie, oeufs d'Amphibiens).

La méthode d'entraînement à la vapeur présentait a priori l'inconvénient d'une sensibilité assez réduite (il faut au moins 1—2 gr. de tissu frais); en outre, elle est lente et demande une surveillance continue. On pouvait toutefois se demander si une solution satisfaisante ne serait pas trouvée dans une combinaison des différentes méthodes offertes: c'est ainsi que BAILEY<sup>21)</sup> a proposé un appareil à microdistillation qui paraissait avantageux, tandis que SUMINOKURA<sup>19)</sup> et PARNAS et UMSCHWEIF<sup>20)</sup> ont précisé les conditions requises pour que l'hydrolyse soit aussi quantitative que possible.

Après quelques essais, l'appareil représenté ci-dessous a été trouvé satisfaisant: il se distingue de celui de BAILEY<sup>21)</sup> par le fait qu'il est construit entièrement en verre (Pyrex) et que le col de la fiole à distiller est plus long; cette modification a dû être introduite parce que certains tissus moussent abondamment (même en présence d'alcools supérieurs ou de paraffine liquide) pendant l'hydrolyse et qu'il en résulte des pertes de substance au cours de la distillation si le col du ballon est trop court.

Voici la technique à suivre: on fait bouillir de l'eau distillée en A, en régularisant l'ébullition au moyen de deux perles de verre; on introduit en B le matériel à analyser (par exemple 30—50 mgr. de tissu préalablement extrait par l'acide trichloracétique) avec 1,5—2 cc. de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  35% (en volume) contenant 8% de sulfate de Zinc et du  $\text{SO}_4\text{K}_2$  à saturation. On connecte la fiole B au générateur de vapeur A et on distille en chauffant au moyen de deux micro-BUNSSENS dont les flammes sont réglées de manière que le volume du liquide diminue lentement en B. La distillation prend fin lorsqu'on voit apparaître des cristaux dans le liquide; généralement l'opération dure environ une demi-heure et la quantité de distillat recueillie s'élève à une quinzaine de cc. (on mesure exactement ce volume). Après avoir bien mélangé le distillat, on en prélève 6 cc., auxquels on ajoute 0,5 cc. d'aniline fraîchement redistillée et 4 cc. d'acide acétique glacial p.a. L'intensité de la couleur rouge qui s'est développée est mesurée au bout d'une demi-heure au photomètre de PULFRICH (filtre S 50). Des essais préalables ont montré que la coloration atteint son intensité maximal environ 25 minutes après le mélange et qu'elle reste stable pendant 10 minutes. Il est bon de dresser une courbe d'étalonnage, chaque fois qu'on utilise de nouveaux réactifs, au moyen d'une solution de furfural redistillé dans le vide. Il y a intérêt, avant de faire les lectures, à ne pas exposer à une lumière trop vive le mélange où se développe la couleur rouge. Ajoutons que pour se familiariser avec la marche de la distillation, il est utile de recueillir au début le distillat par fractions de 6 cc. et de faire le dosage sur chacune de ces fractions; dans de bonnes conditions de chauffage, on recueillera trois fois 6 cc. et on trouvera le maximum de furfural dans la portion qui a distillé en second lieu.

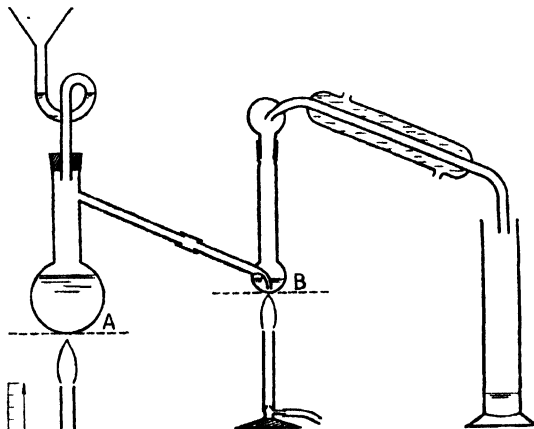


Fig. 1.

Cette technique nous a donné des résultats très satisfaisants tout en présentant de sérieux avantages sur la méthode de SUMINOKURA<sup>19)</sup> que nous avons employée antérieurement: la quantité de substance mise en oeuvre est réduite de 50 à 100 fois et la durée de l'opération est raccourcie 5 à 6 fois. La rapidité accrue de la distillation rend superflue la précaution préconisée par SUMINOKURA<sup>19)</sup> de distiller dans une atmosphère de  $\text{CO}_2$ . Enfin, le rendement en furfural du xylose est supérieur à celui obtenu par PARNAS et UMSCHWEIF<sup>20)</sup> qui maintiennent constante la concentration de l'acide sulfurique pendant la plus grande partie de la distillation.

Le tableau suivant fournit, à titre de justification, les résultats de quelques analyses effectuées sur du xylose (MERCK p.a.) et de l'acide zymonucléique (MERCK); ce dernier n'étant



pas entièrement pur, la concentration exacte de la solution à doser a été établie par dosage du P organique suivant BERENBLUM et CHAIN<sup>22</sup>).

TABLEAU I.

Substance utilisée	Quantité employée	Rendement théorique en furfural	Furfural trouvé en $\gamma$	Différence en %
Xylose	60 $\gamma$	38,4 $\gamma$	37,9	-1,3
	60 $\gamma$	38,4 $\gamma$	38,0	-1,1
	60 $\gamma$	38,4 $\gamma$	38,2	-0,6
	30 $\gamma$	19,2 $\gamma$	18,4	-3,9
	30 $\gamma$	19,2 $\gamma$	19,5	+1,4
	30 $\gamma$	19,2 $\gamma$	19,2	0,0
	15 $\gamma$	9,6 $\gamma$	9,6	0,0
	15 $\gamma$	9,6 $\gamma$	9,5	-1,0
	15 $\gamma$	9,6 $\gamma$	9,5	-1,0
			Moyenne	-0,8
Acide zymo-nucléique	200.	58,8	56,5	-3,5
	200.	58,8	56,9	-3,3
	200.	58,8	57,8	-1,6
	200.	58,8	60,5	+2,7
	200.	58,8	56,9	-3,3
	100.	29,4	28,5	-3,0
	100.	29,4	30,1	+2,1
	100.	29,4	29,4	0,0
	100.	29,4	28,8	-2,0
	100.	29,4	30,3	+3,0
	50.	14,7	14,7	0,0
	50.	14,7	14,5	-1,3
	50.	14,7	15,2	+3,1
	50.	14,7	14,6	-0,6
	50.	14,7	14,8	+0,6
			Moyenne	-0,5

Ces chiffres supportent favorablement la comparaison avec les valeurs que l'on trouve dans la littérature; le rendement en ce qui concerne le xylose est nettement supérieur à celui (84%) obtenu par PARNAS et UMSCHWEIF<sup>20</sup>). En ce qui concerne l'acide zymonucléique, HOFFMANN<sup>18</sup>) par hydrolyse à HCl ne trouve que 51—53% du furfural théorique, parce que cet acide n'attaque pratiquement pas les nucléotides pyrimidiques (STEUDEL<sup>23</sup>)). Quant au chiffre donné par SUMINOKURA<sup>19</sup>), il excède le rendement théorique; s'il se rapportait toutefois au pentose et non au furfural, il coïnciderait en fait avec celui que nous avons déterminé.

Passons à l'examen de quelques causes d'erreurs susceptibles de fausser le dosage dans le cas de tissus animaux: la présence d'acide thymonucléique, même lorsqu'il s'agit d'organes riches en noyaux, demeure sans influence pratique: 1 mgr. de cet acide ne donne en effet que 2,1  $\gamma$  de furfural par hydrolyse (soit 150 fois moins que l'acide zymonucléique). Par contre, les hexoses ou le glycogène peuvent constituer une cause d'erreurs appréciable, dans les organes où ces glucides se trouvent en abondance: après hydrolyse suivant la technique décrite ci-dessus, ils donnent 3,7 à 3,9% de furfural (au lieu de 63,3% pour le xylose). Nous avons observé à différentes reprises des résultats anormaux en dosant le furfural produit par hydrolyse du foie ou d'oeufs d'Amphibiens: dans les extraits trichloracétiques de larves d'Amphibiens, par exemple, la teneur en „pentoses" excède de beaucoup celle que l'on s'attendait à trouver en se basant sur la quantité de P organique présente. Si on broie des oeufs d'Amphibiens dans de l'eau et qu'on centrifuge, on peut précipiter par l'acide acétique dilué un nucléoprotéide (riche en P et en pentoses) de la phase aqueuse; le liquide obtenu par centrifugation de ce nucléoprotéide se précipite par addition d'alcool; si on recueille ce précipité, on constate qu'il ne contient que de faibles quantités de P tandis qu'il donne du furfural en abondance par hydrolyse: il s'agit évidemment de glycogène. Complétons cet aperçu par quelques résultats obtenus sur le foie

de pigeon: le résidu obtenu après extraction trichloracétique contient 0,096% de furfural; le liquide d'extraction en contient 0,219%. Mais si on essaie de précipiter les nucléotides par l'urane ou l'acide adénosinetriphosphorique par le baryum, on ne trouve plus que 0,007 à 0,008%. Ces constatations cadrent parfaitement avec les observations de PARNAS et UMSCHWEIF 20) sur le muscle; ces auteurs trouvent en effet trop de furfural pour le taux de nucléotides dans l'extrait trichloracétique. Ils attribuent cette différence à la présence de coferments pyridiniques, mais il nous semble plus vraisemblable qu'il s'agit du glycogène. Les discordances existant entre les résultats de PARNAS et UMSCHWEIF et ceux de FERDMANN 24) tiennent sans doute à cette circonstance. En tous cas, les méthodes de dosage des pentoses (distillation, orcine) ne doivent pas être utilisées sans précautions complémentaires pour l'estimation des nucléotides dans les extraits trichloracétiques des organes riches en glycogène. Cette cause d'erreurs peut être heureusement fort réduite dans le cas des pentosenucléoprotéides qui nous intéresse: on sait en effet que la majeure partie du glycogène (lyo-glycogène) est facilement extraite par l'acide trichloracétique (WILLSTÄTTER et ROHDEWALD 25)); il en est notamment ainsi dans les oeufs d'Amphibiens (BRACHET et NEEDHAM 26)). Les dosages que nous avons effectués ont donc toujours porté sur des tissus préalablement extraits par l'acide trichloracétique (10%) à 1 ou 2 reprises; cette précaution paraît suffisante pour que le desmo-glycogène, qu'on ne trouve qu'en faibles proportions, n'exerce plus qu'une influence négligeable sur le dosage des pentoses.

On n'ignore pas que l'acide glycuronique donne des quantités importantes de furfural par hydrolyse: il en résulte que le dosage des pentoses sera entaché d'erreurs dans les tissus riches en glycoprotéides (cartilage, mucus). Nous avons constaté que le cartilage de la trachée (lapin) donne 0,17% de furfural par hydrolyse; il se colore par la pyronine, mais en présentant de la métachromasie. Comme cette coloration n'est pas affectée par la ribonucléase, il ne s'agit pas d'acide pentosenucléique. La gangue muqueuse qui entoure les oeufs d'Amphibiens fournit aussi du furfural en abondance (0,25%); il en résulte une cause d'erreurs sérieuse qui nous a conduit à une interprétation inexacte des faits dans un travail précédent (11): comparant la teneur en pentoses d'oeufs vierges non dégangues à celle de tétards éclos, nous avons constaté une diminution. Comme on le verra plus loin, il y a au contraire une synthèse de pentosenucléoprotéides pendant le développement embryonnaire; on ne peut mettre ce fait en évidence qu'en utilisant des oeufs dégangues.

Ces quelques exemples montrent qu'une certaine prudence s'impose lorsqu'on veut effectuer des dosages de pentoses dans les tissus animaux; d'autres causes d'erreurs, jusqu'à présent insoupçonnées, existent peut-être encore. Les résultats exposés plus loin montrent toutefois qu'il est peu probable qu'elles soient importantes; il semble donc bien qu'on puisse aboutir à des valeurs correctes lorsqu'on prend préalablement la précaution d'extraire le glycogène et qu'on évite de travailler sur des tissus riches en glycoprotéides.

### 3. Résultats expérimentaux.

La plupart des mesures ont été effectuées dans le but de comparer, chez les Vertébrés (Lapin, Grenouille rousse), la teneur en pentoses des organes à leur basophilie. Les chiffres obtenus chez des animaux différents se ressemblent suffisamment pour que nous puissions nous contenter de donner ici les résultats d'une série de dosages portant sur un même animal (à l'exception des organes génitaux).

TABEAU II.

Animal utilisé	Organe	Furfural en mgr. %	Moyenne
Lapin	Pancréas . . . . .	0,428 — 0,419 — 0,455	0,424
	Parotide . . . . .	0,231 — 0,236 — 0,232	0,233
	Muqueuse intestinale . . . . .	0,147 — 0,159 — 0,154 — 0,150	0,152
	Muqueuse gastrique . . . . .	0,145 — 0,139 — 0,145 — 0,133 — 0,134	0,139
	Foie . . . . .	0,129 — 0,144 — 0,132 — 0,140	0,134
	Rate . . . . .	0,107 — 0,117 — 0,120	0,115
	Testicule . . . . .	0,105 — 0,104 — 0,119 — 0,104 — 0,106	0,108
	Ganglions lymphatiques . . . . .	0,096 — 0,103	0,100
	Thymus . . . . .	0,101 — 0,092 — 0,097	0,097
	Rein . . . . .	0,079 — 0,076 — 0,077	0,077
	Moelle osseuse . . . . .	0,063 — 0,054 — 0,058	0,058
	Muscleuse de l'estomac . . . . .	0,056 — 0,056 — 0,052	0,055
	Coeur . . . . .	0,040 — 0,036 — 0,032	0,036
	Poumon . . . . .	0,037 — 0,033 — 0,037	0,036

TABLEAU II (suite).

Animal utilisé	Organe	Furfurol en mgr. %	Moyenne
Grenouille	Pancréas . . . . .	0,255 — 0,271 — 0,244	0,257
	Foie . . . . .	0,152 — 0,140 — 0,149 — 0,154	0,149
	Muqueuse intestinale . . . . .	0,186 — 0,131 — 0,141	0,136
	Muqueuse gastrique . . . . .	0,136 — 0,180 — 0,120 — 0,180	0,129
	Ovaire . . . . .	0,092 — 0,083 — 0,095 — 0,080	0,087
	Testicule . . . . .	0,063 — 0,064 — 0,060 — 0,060	0,062
	Rein . . . . .	0,055 — 0,061 — 0,059	0,058
	Poumon . . . . .	0,055 — 0,051	0,053
	Cerveau . . . . .	0,050 — 0,045	0,047
	Muscle estomac . . . . .	0,041 — 0,045	0,043
	Muscle . . . . .	0,037 — 0,035 — 0,030	0,034
	Coeur . . . . .	0,029 — 0,034	0,031

Ainsi qu'on peut le constater, les résultats sont assez comparables chez la grenouille et le lapin; dans les deux cas, le tube digestif et ses glandes annexes se distinguent par leur richesse en pentoses. On se souvient que ces organes se caractérisaient par une vive affinité pour la pyronine. Les organes lymphoïdes, les glandes génitales sont modérément colorables par la méthode de UNNA: on aura observé qu'ils occupent une place intermédiaire dans le tableau ci-dessus. Enfin, les autres organes examinés n'ont guère d'affinité pour la pyronine, à l'exception du système nerveux où les blocs de NISSL se colorent vivement; mais les neurones qui les contiennent sont noyés dans la masse de la névroglie et des fibres nerveuses.

Le parallélisme entre les résultats fournis par les deux méthodes utilisées apparaît donc comme très satisfaisant; voyons s'il n'est pas possible de le pousser plus loin. Nous avons montré précédemment (27) qu'il se produit au cours de l'oogénèse, chez les Amphibiens, une diminution progressive de la basophilie. Dans les gros oocytes, seuls les nucléoles sont encore fortement colorables; ils perdent, tout comme le cytoplasme des jeunes oocytes, leur basophilie par action de la ribonucléase. Il est facile de séparer sous la loupe les jeunes des gros oocytes; on peut même isoler assez aisément les noyaux de ces derniers. Si la basophilie est réellement en rapport avec la présence d'acide pentosenucléique, on devrait s'attendre à trouver dans les jeunes oocytes une teneur en pentoses supérieure à celle de l'ovaire entier (0,087%); les gros oocytes contiendraient au contraire moins de pentoses, tandis que les noyaux isolés, où les nucléoles n'ont qu'une valeur quantitative réduite, devraient se révéler pauvres en ces substances. Le tableau ci-dessous montre que l'expérience confirme entièrement ces prévisions.

TABLEAU III.

Matériel employé	Furfurol en mgr. %	Moyenne
Jeunes oocytes ( <i>Rana fusca</i> )	0,183 — 0,189 — 0,197 — 0,216 — 0,219 — 0,232	0,206
Gros oocytes ( <i>Rana fusca</i> )	0,067 — 0,062 — 0,062 — 0,062 — 0,077 — 0,062	0,065
Noyaux de gros oocytes ( <i>Rana fusca</i> )	0,056 — 0,050 — 0,041	0,049

En suivant le développement ultérieur de ces oeufs, nous avons constaté (27) une augmentation continue de la basophilie suivant des règles très précises: cette synthèse débute par la moitié animale de l'oeuf; pendant la gastrulation, elle est nettement plus active dans la région dorsale de l'oeuf (organisateur) que dans la partie ventrale; plus tard, c'est le système nerveux et la corde qui se signalent par leur affinité pour la pyronine. Les chiffres ci-dessous prouvent bien que le développement des Amphibiens s'accompagne d'une synthèse de pentoses; en outre,

les mesures faites sur des explantats au stade gastrula montrent que l'organisateur est particulièrement riche en ce genre de substances.

TABLEAU IV.

Matériel utilisé	Stade	Furfurol en $\gamma$ /oeuf	Moyenne	Augmentation en % par rapport à l'oeuf fécondé
<i>Rana fusca</i>	Fécondation	2,65; 2,9; 2,6; 2,9	2,75	—
	Gastrulas	3,0; 3,2; 3,0; 3,1	3,1	11,2
	Jeunes têtards	4,4; 4,7; 4,4; 4,6; 4,75	4,6	67,2
Axolotl	Fécondation	4,55; 4,9; 4,8; 4,65; 4,8; 4,8	4,75	—
	Gastrulas	4,8; 5,3; 5,2; 5,1; 5,1	5,1	7,2
Axolotl	Fécondation	5,6; 5,5; 5,8; 6,0; 5,9; 6,1; 5,9; 6,1	5,9	—
	Neurulas	7,25; 7,7; 7,0; 6,9; 7,5; 7,0; 7,5; 6,95	7,25	22,9
Axolotl	Fécondation	4,35; 4,15; 4,85; 4,4	4,45	—
	Jeunes têtards	7,05; 7,4; 6,85; 7,5	7,2	61,6

TABLEAU V.

Fragments de gastrulas (Axolotl).

(Chiffres exprimés en  $\gamma$ /mgr. Les valeurs données dans les deux colonnes se correspondent, les explantats provenant des mêmes oeufs).

Fragments dorsaux	Fragments ventraux	Différence en %
0,23	0,20	13,0
0,38	0,33	13,1
0,45	0,38	15,6
0,68	0,55	19,1
0,82	0,59	28,0
0,86	0,60	30,2
0,84	0,56	33,3

Les quelques dosages effectués sur les Invertébrés ont pleinement confirmé le parallélisme entre l'affinité pour la pyronine et la présence de pentosenucléoprotéides: des larves de *Drosophila*, les glandes salivaires de *Chironomus*, qui se distinguent par leur vive basophilie, donnent aussi du furfurol en abondance par hydrolyse (de l'ordre de 0,2%). Chez la Planaire, l'examen histologique de l'animal normal laisse supposer une répartition sensiblement homogène des acides pentosenucléiques; les dosages sur des fragments de l'animal ont donné les chiffres suivants (moyenne de 4 expériences) en allant de la tête vers le queue: 0,118; 0,111; 0,110 et 0,118%. Il n'existe donc pas chez cette forme de gradient antéro-postérieur des pentosenucléoprotéides.

Un dernier point reste à envisager: nous avons signalé plus haut que le comportement des noyaux envers la pyronine et la ribonucléase laisse supposer la présence d'acides pentosenucléiques au niveau de la chromatine. Quelques dosages ont été effectués, afin d'élucider ce point, sur des noyaux d'intestin de grenouilles isolés par la méthode de STONEBURG<sup>28</sup>) à l'acide citrique; ces noyaux peuvent être isolés aisément dans un état de grande pureté, comme l'atteste l'examen

microscopique. Nous nous sommes assuré que l'acide citrique n'exerce aucune influence sur le rendement en furfural de l'acide thymonucléique. Le traitement par l'acide citrique ne modifie d'ailleurs pas l'intensité de la réaction de FEULGEN fournie par les noyaux isolés; il tend à accentuer la colorabilité par la pyronine aux dépens de celle par le vert de méthyle; mais la ribonucléase fait entièrement disparaître l'affinité des noyaux isolés pour la pyronine. Dans chaque expérience, la teneur en pentoses, en P organique (suivant BERENBLUM et CHAIN<sup>22</sup>), en acide thymonucléique (méthode de DISCHE<sup>29</sup>) et en eau a été déterminée. Voici les résultats obtenus, exprimées en % du poids humide.

TABLEAU VI.

Acide thymonucléique	Furfural	P
3,3	0,102	0,44
3,1	0,097	0,43
3,9	0,122	0,47
3,7	0,132	0,445
3,4	0,099	0,44
3,5	0,110	0,445

Si on rapporte ces chiffres au poids sec, on obtient en moyenne: P: 3.30%; acide thymonucléique 25.9% (soit 2.53% de P); furfural 0.816%, correspondant à 2.82% d'acide zymonucléique (0.27% de P). Les valeurs obtenues pour l'acide thymonucléique et le P concordent de façon assez satisfaisante avec celles données par BEHRENS<sup>30</sup>) et par CASPERSSON<sup>31</sup>). La quantité totale de P nucléique (2.8%) est un peu inférieure au P total (3.3%): la différence tient sans doute à la présence de phosphatides dans le noyau (STONEBURG<sup>28</sup>)). Ces expériences démontrent en tous cas que le noyau renferme de petites quantités d'acides pentosenucléiques, conformément à ce que la méthode de UNNA laissait supposer; on remarquera d'ailleurs que les chiffres obtenus se rapprochent fortement de ceux auxquels nous sommes arrivés, chez le lapin, pour les organes riches en noyaux (ganglions lymphatiques, rate, thymus). Ajoutons encore que nos résultats sur les noyaux isolés ne sont nullement en opposition avec ceux de JORPES<sup>9</sup>) qui n'a pas trouvé de pentoses dans les spermatozoïdes mûrs de la lotte: les têtes des spermatozoïdes prennent en effet exclusivement le vert de méthyle et leur coloration n'est pas affectée par la ribonucléase; la méthode histochimique indique donc qu'ils doivent être pauvres en pentosenucléoprotéides.

#### 4. Conclusions.

Les dosages des pentoses, confirmant les données fournies par la technique histochimique, nous montrent que les acides ribonucléiques sont abondamment répandus dans le règne animal; ils présentent toutefois des localisations bien précises qui ne nous permettent malheureusement pas de préjuger de leur rôle physiologique. CASPERSSON et SCHULTZ<sup>7</sup>) qui aboutissent à des conclusions voisines des nôtres, pensent que les acides pentosenucléiques se rencontreraient principalement dans les tissus en voie de croissance active. Cette présomption est appuyée par nos recherches, mais on ne peut admettre pourtant une localisation exclusive des acides pentosenucléiques dans des cellules en voie de prolifération: les mitoses sont exceptionnelles dans le pancréas et le foie et inexistantes au niveau des neurones. La conclusion de CASPERSSON et SCHULTZ demande donc à être élargie et on peut se demander si la présence d'acides pentosenucléiques n'est pas liée à des phénomènes d'élaboration des protéines \*) celles-ci sont produites en abondance dans le tube digestif et ses glandes annexes (ferments), les oeufs en voie de croissance (vitellus), les tissus en voie de régénération. Il se peut d'ailleurs que les acides pentose-

\*) CASPERSSON, dans un travail tout récent (Naturwiss. 29, 33 (1941)) arrive maintenant à la même conclusion que nous (addendum lors de la correction des épreuves).

nucléiques n'aient pas les mêmes fonctions dans ces divers organes: il paraît assez plausible que dans le foie, peut-être dans les neurones, ils constituent plutôt une substance de réserve: les observations histologiques de BERG<sup>32)</sup> et de STUBEL<sup>6)</sup> montrent en effet que les éléments basophiles du foie disparaissent à la suite du jeûne et font leur réapparition lorsque l'animal est soumis à un régime riche en protéines.

De nombreuses inconnues subsistent en ce qui concerne la nature chimique exacte des substances en cause: il y a cependant lieu de noter que l'efficacité de la ribonucléase prouve bien qu'il s'agit de polynucleotides (sans doute voisins ou identiques à l'acide zymonucléique) et non de mononucleotides qui se seraient combinés aux protéines.

La synthèse des pentosenucléoprotéides au cours du développement embryonnaire chez les Amphibiens va de pair avec la synthèse de l'acide thymonucléique qui se produit consécutivement à la multiplication des noyaux (11). Il serait prématuré de chercher à préciser si les deux phénomènes sont liés l'un à l'autre. Les chiffres donnés dans ce travail concordent bien avec ceux obtenus par GRAFF et BARTH<sup>33)</sup> pour l'azote purique: ces auteurs ont en effet observé une synthèse de purines pendant le développement des Amphibiens. Nous ne pouvons néanmoins nous rallier à l'interprétation qu'ils en donnent: ils admettent qu'il s'agirait d'une synthèse exclusive d'acide thymonucléique qui ne commencerait qu'avec la morphogénèse; pendant la segmentation, l'acide thymonucléique préexisterait dans le cytoplasme. Cette conception est en opposition complète avec nos résultats antérieurs (11) et présents. Il convient d'insister sur le fait que la mesure du P nucléique ou du N purique ne nous renseigne nullement sur l'acide thymonucléique, mais uniquement sur la somme des deux acides nucléiques. Il serait dangereux de voir dans ces constituants un index de la teneur d'un tissu en noyaux, puisque l'acide pentosenucléique se rencontre surtout dans le cytoplasme.

Les dosages effectués sur les oeufs d'Amphibiens n'apportent évidemment aucun argument en faveur de l'hypothèse que nous avons émise (10, 11) au sujet d'une origine possible de l'acide thymonucléique à partir d'un acide pentosenucléique; ils n'infirmement cependant pas cette supposition, parce qu'il n'est pas exclu qu'une partie des acides pentosenucléiques synthétisés soit utilisée pour l'élaboration d'acide thymonucléique. Certaines observations (présence d'acide pentosenucléique dans le noyau, en particulier dans le nucléole) cadrent même bien avec l'hypothèse d'une filiation entre les deux types d'acides nucléiques.

Enfin, les dosages d'acides pentosenucléiques ont permis d'établir une nouvelle différence chimique entre l'organisateur et les territoires ventraux correspondants; cette observation rejoint celles qui ont été faites relativement au plasmalogène (Voss<sup>34)</sup>), à la glycolyse (BOELL, NEEDHAM et ROGERS<sup>35)</sup>), au quotient respiratoire (BRACHET<sup>36)</sup>), BOELL, KOCH et NEEDHAM<sup>37)</sup>), à la glycogénolyse (HEATLEY<sup>38)</sup>), HEATLEY et LINDAHL<sup>39)</sup>), aux protéines sulfhydrylées (27). Ces faits ne sont pas aussi disparates qu'il le paraîtrait à première vue: des pentosenucléoprotéides combinés au plasmalogène ont été isolés à partir d'embryons de Poulet et de Souris par CLAUDE<sup>40)</sup>. Certaines relations possibles entre le métabolisme hydrocarboné et l'acide zymonucléique ont été soulignées par OSTERN et ses collaborateurs (41). La question de savoir s'il existe une relation entre la présence de pentosenucléoprotéides dans l'organisateur et ses capacités d'induction est encore prématurée; on peut toutefois rappeler que FISCHER<sup>42)</sup> a signalé une forte activité inductrice des nucléoprotéides et de leurs dérivés et que BARTH<sup>43)</sup> assigne une capacité d'induction maxima à une fraction des oeufs d'Amphibiens qui est précisément la plus riche, d'après nos essais, en pentosenucléoprotéides. Enfin, nous avons constaté (expériences non encore publiées) que le traitement par la ribonucléase des organisateurs tués réduit fortement leur pouvoir inducteur. Tous ces faits rendent assez vraisemblable une intervention active des pentosenucléoprotéides dans les phénomènes d'induction neurale.

### Résumé.

1. Une technique de détection histochemique des acides pentosenucléiques sur coupes histologiques a été mise au point; les principaux résultats sont résumés.
2. Une microméthode de dosage des pentoses (10—60  $\gamma$ ) dans les tissus animaux

(30—50 mgr.) est décrite; la teneur en pentoses de nombreux organes a été déterminée. Cette méthode confirme entièrement les résultats histochimiques.

3. Il se produit une synthèse de pentosenucléoprotéides au cours du développement embryonnaire chez les Amphibiens; laèvre dorsale du blastopore (organisateur) contient plus de pentoses que la région ventrale correspondante.

4. Les noyaux contiennent, outre de l'acide thymonucléique, de petites quantités d'acide pentosenucléique.

### Summary.

1. A technique for the histochemical detection of pentosenucleic acids has been devised; the main results are summarized.

2. A micromethod for the quantitative estimation of pentoses (10—60  $\gamma$ ) in animal tissues (30—50 mgr.) has been described; the pentose content of many organs has been established. This method thoroughly confirms the histological findings.

3. There is a marked synthesis of pentosenucleoproteins during embryonic development in Amphibians; the dorsal lip (organizer) of the blastoporus has a higher pentose content than the corresponding ventral piece.

4. The nuclei contain small amounts of pentosenucleic acid besides thymonucleic acid.

- 1) J. Brachet, Soc. Biol. **133**, 88 (1940). — 2) R. J. Dubos, C. M. MacLeod, JI. of Exp. Med. **67**, 791 (1938). — 3) R. J. Dubos, R. H. S. Thompson, JI. of Biol. Chem. **124**, 501 (1938). — 4) G. Schmidt, P. A. Levene, JI. of Biol. Chem. **126**, 423 (1938). — 5) M. Kunitz, Science (N.Y) **1939** (II) p. 112. — 6) H. Stübel, Arch. ges. Phys. (PFLÜGER) **185**, 74 (1920). — 7) T. Caspersson, J. Schultz, Nature **143**, 602 (1939). — 8) E. Jorpes, JI. of Biol. Chem. **86**, 469 (1930). — 9) E. Jorpes, Acta med. Scand. **68**, 253, 503 (1928). — 10) J. Brachet, Arch. de Biol. **44**, 519 (1933). — 11) J. Brachet, ibid. **48**, 529 (1937). — 12) M. van der Ghinst, ibid. **45**, 729 (1935). — 13) L. B. Mendel, C. S. Leavenworth, Amer. JI. Phys. **21**, 77 (1908). — 14) G. Grund, Zs. physiol. Chem. **85**, 111 (1902). — 15) E. Bendix, E. Ebbstein, Zs. allg. Physiol. **2**, 1 (1902). — 16) Z. Dische, K. Schwartz, Mikrochim. Acta **2**, 13 (1937). — 17) W. Mejbaum, Zs. physiol. Chem. **258**, 117 (1939). — 18) W. S. Hoffmann, JI. of Biol. Chem. **78**, 15 (1927). — 19) K. Suminokura, JI. of Biochem. **14**, 343 (1931). — 20) J. K. Parnas, B. Umschweif, Bull. Soc. Chim. Biol. **19**, 325 (1937). — 21) A. J. Bailey, Mikrochim. Acta **2**, 35 (1937). — 22) I. Berenblum, E. Chain, Biochem. JI. **32**, 286 (1938). — 23) H. Steudel, Zs. physiol. Chem. **242**, 100 (1936). — 24) D. Ferdmann, Zs. physiol. Chem. **216**, 205 (1933). — 25) R. Willstätter, M. Rohdewald, Zs. physiol. Chem. **225**, 103 (1934). — 26) J. Brachet, J. Needham, Arch. de Biol. **46**, 821 (1935). — 27) J. Brachet, ibid. **51**, 167 (1940). — 28) C. A. Stoneburg, JI. of Biol. Chem. **129**, 189 (1939). — 29) Z. Dische, Mikrochemie **2**, 4 (1930). — 30) M. Behrens, Zs. physiol. Chem. **209**, 59 (1932). — 31) T. Caspersson, Skand. Arch. Phys. **78**, Suppl. n° 8 (1936). — 32) W. Berg, Zs. mikr. Anat. Forsch. **12**, I (1927). — 33) S. Graff, L. G. Barth, Cold Spring Harbor Symp. **6**, 103 (1938). — 34) H. Voss, Zs. Anat. Entw. Gesch. **94**, 712 (1931). — 35) E. J. Boell, J. Needham, V. Rogers, Proc. Roy. Soc. B **127**, 322 (1939). — 36) J. Brachet, Arch. de Biol. **50**, 233 (1939). — 37) E. J. Boell, H. Koch, J. Needham, Proc. Roy. Soc. B. **127**, 363 (1939). — 38) N. G. Heatley, Biochem. JI. **29**, 2568 (1935). — 39) N. G. Heatley, P. E. Lindahl, Proc. Roy. Soc. B. **122**, 395 (1937). — 40) A. Claude, Science (N.Y) **91**, 77 (1940). — 41) P. Ostern, J. Terszakowec, S. Hübl, Zs. physiol. Chem. **255**, 104 (1938).

# The contraction accompanying enzymatic break-down of proteins \*)

BY

K. LINDERSTRØM-LANG AND C. F. JACOBSEN

*(Carlsberg Laboratory, Copenhagen)*

With 17 figures.

(6.III.41.)

## Contents.

	Page
I. Introduction .....	97
II. Theoretical part .....	98
A. Splitting of peptides containing simple amino acids with uncharged side chains....	98
1. The necessary data .....	98
2. The splitting of peptides in the isoelectric zone .....	103
3. The splitting of peptides in the ph range 6—10 with or without addition of buffers	103
4. Comparison with previous experiments. Dipeptide splitting in the whole ph range	108
from 0.5 to 13.5 .....	108
B. Splitting of peptides with charged side chains .....	110
C. Splitting of proteins .....	111
III. Experimental part .....	114
A. Materials .....	114
B. Some determinations of the volume change accompanying proton transfers in aqueous	114
solutions .....	114
C. Enzymatic experiments .....	114
1. Determination of carboxyl groups .....	116
2. Determination of amino groups .....	116
3. Preparation of enzyme and substrate solutions .....	116
4. Details of sampling etc. ....	117
5. Results and discussion .....	117
IV. Summary .....	125

## I. Introduction.

The volume change accompanying chemical reactions in liquid systems has been studied in a great number of cases. In spite of this, comparatively few investigations exist on the break-down of proteins and related substances, a situation which probably has entered because of the high degree of complexity of the processes taking place. Apart from the investigations by RONA and SREENIVASAYA and their coworkers<sup>1-5)</sup> little has been done to explore this field experimentally (*v.a.*<sup>6)</sup>). Theoretically the problem is highly complex and can only be treated very roughly. We believe however that the calculations found in the theoretical part of the present paper will serve to elucidate certain features of the problem.

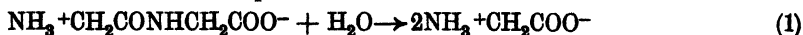
In the experimental part of this paper the volume change accompanying the enzymatic break-down of lactoglobulin and clupein has been determined. The results show definitely that the break-down of lactoglobulin cannot be explained exclusively as an opening up of peptide linkages in a simple peptide chain, while the splitting of clupein is in good agreement with this assumption. For the rest we refer to the discussion page 108.

\*) Supported by a grant from *The Rockefeller Foundation*.



## II. Theoretical part.

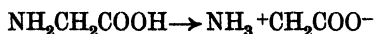
From the data available in the literature it is apparent that the contraction accompanying the splitting of proteins and peptides in about neutral solution is very great as compared to that observed, e.g., in the case of carbohydrate hydrolysis. The reason for this must be sought in the increase in the number of electric charges which accompanies the opening of the peptide bond. The splitting of glycylglycine at pH 6 for example involves the disappearance of a dipeptide dipole and the formation of 2 amino acid dipoles:



i. e., two new charges have appeared which will be surrounded by compressed water and thus give rise to a contraction. Outside of the isoelectric zones of peptides and amino acids the prevailing conditions are more complicated because part of the ampholytes are present as ions, but a closer investigation shows that the new-formation of charges will predominate in the whole pH region from 2 to 10 and thus be an important factor in the determination of the volume change.

It is therefore of interest to examine this side of the hydrolytic process more closely, in other words to determine the volume change due to changes in amount and position of electric charges, disregarding the volume change accompanying the plain water addition and the breaking of the bond. This latter volume change we are unable to say much about. It probably varies considerably with the constitution of the amino acid entering into the peptide chain, but a comparison with other hydrolytic processes (e.g., hydrolysis of carbohydrates), in which no charges appear, leads to the assumption that it is small. This is supported by calculations carried out in the present paper indicating a value for this volume change of around + 2 ml per mol peptide bond split in case of the hydrolysis of alanyl-glycine by dipeptidase. Since the corresponding total volume change was found to be -9 ml/mol (6) we feel justified in regarding the volume change accompanying the actual hydrolysis as small in comparison with the volume change due to electrostriction.

The following treatment is essentially based upon investigations by WEBER and NACHMANSOHN (7, 8), COHN, Mc MEEKIN, EDSALL and BLANCHARD (9), Mc MEEKIN, COHN and WEARE (10), and GREENSTEIN and WYMAN (11). In WEBER's and NACHMANSOHN's investigations the volume change accompanying ion and dipole formation was measured directly using the dilatometric method. Unfortunately a complete set of data cannot be obtained in this way because the volume change accompanying the reaction,



and others of the same type is not open to direct measurement. COHN, Mc MEEKIN, EDSALL and BLANCHARD have determined the apparent molal volume of a great number of amino acids and dipeptides but the calculation from these data of the electrostriction produced by dipoles and ions meets with the difficulty of estimating the apparent molal volumes of the same substances without electric charges. Such an estimation may be done partly on the basis of TRAUZE's theory (13) partly by measuring the apparent molal volumes of uncharged isomers (in the case of glycylglycine e.g., that of carbaminyalanine (10)) but neither of the methods are completely satisfactory and consequently the values found are somewhat uncertain. One thing however appears with certainty from the entire material at hand, viz., that the electrostriction varies considerably from one amino acid to another or from one dipeptide to another, i. e., the electrostriction is not only a function of the distances between the charges but also of the general constitution of the molecules in question. A general survey of the problem concerning the hydrolysis of proteins and peptides is therefore only possible if certain simplifying assumptions are introduced. The procedure chosen will appear from the considerations in the following section.

### A. Splitting of peptides containing simple amino acids with uncharged side chains.

1. The necessary data. According to WEBER (8) we have

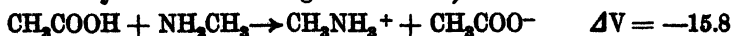


TABLE I.  
G = Glycine; A = Alanine; L = Leucine; GG = Glycylglycine etc.

Reference	No.	Reaction	$\Delta V$ found	$\Delta V$ calc.
(page 115) (8)	1	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{NH}_4^+$ $\text{CH}_3\text{CONHCH}_2\text{COOH} + \text{NH}_3 \rightarrow \text{CH}_3\text{CONHCH}_2\text{COO}^- + \text{NH}_4^+$ $\text{CH}_3\text{CONHCH}_2\text{COO}^- + \text{NH}_3 \rightarrow \text{CH}_3\text{CONHCH}_2\text{COO}^- + \text{NH}_3$	-17.4 -15.8 -17.4	$\Delta V_{\text{ion}} = -18$ $\Delta V_{\text{ion}} = -17$
(8)	2	$\text{G}^- + \text{G}^+ \rightarrow 2^+\text{G}^-$ $\text{A}^+ + \text{G}^- \rightarrow \text{A}^- + \text{G}^-$ $\text{A}^- + \text{G}^+ \rightarrow \text{A}^- + \text{G}^-$ $\text{A}^- + \text{A}^+ \rightarrow 2^+\text{A}^-$	-8.9 -9.9 -7.9 -8.9	$2 \Delta V_{\text{dp}} - \Delta V_{\text{ion}} = -9$
	3	$\text{GG}^- + \text{G}^+ \rightarrow \text{GG}^- + \text{G}^-$ $\text{GG}^- + \text{A}^+ \rightarrow \text{GG}^- + \text{A}^-$ $\text{GG}^+ + \text{G}^- \rightarrow \text{GG}^- + \text{G}^-$ $\text{GG}^+ + \text{A}^- \rightarrow \text{GG}^- + \text{A}^-$ $\text{AG}^- + \text{G}^+ \rightarrow \text{AG}^- + \text{G}^-$ $\text{LG}^- + \text{G}^+ \rightarrow \text{LG}^- + \text{G}^-$	-12.1 -13.1 -11.0 -10.0 -11.2 -10.9	$\Delta V_{\text{dp}} + \Delta V_{\text{ldp}} - \Delta V_{\text{ion}} = -11.5$
	4	$\text{GG}^- + \text{GG}^+ \rightarrow 2^+\text{GG}^-$ $\text{AG}^- + \text{GG}^+ \rightarrow \text{AG}^- + \text{GG}^-$ $\text{AG}^+ + \text{GG}^- \rightarrow \text{AG}^- + \text{GG}^-$ $\text{AG}^- + \text{AG}^+ \rightarrow 2^+\text{AG}^-$ $\text{LG}^- + \text{AG}^+ \rightarrow \text{LG}^- + \text{AG}^-$ $\text{LG}^+ + \text{AG}^- \rightarrow \text{LG}^- + \text{AG}^-$ $\text{LG}^- + \text{LG}^+ \rightarrow 2^+\text{LG}^-$	-14.2 -18.3 -15.2 -14.3 -13.0 -15.6 -14.4	$2 \Delta V_{\text{ldp}} - \Delta V_{\text{ion}} = -14$
(page 115) and (8)	5	$\text{AGG}^- + \text{G}^+ \rightarrow \text{AGG}^- + \text{G}^-$ $\text{AGG}^- + \text{A}^+ \rightarrow \text{AGG}^- + \text{A}^-$ $\text{AGG}^+ + \text{G}^- \rightarrow \text{AGG}^- + \text{G}^-$ $\text{AGG}^+ + \text{A}^- \rightarrow \text{AGG}^- + \text{A}^-$	-12.2 -13.2 -11.9 -10.9	$\Delta V_{\text{dp}} + \Delta V_{\text{ldp}} - \Delta V_{\text{ion}} = -12.5$
	6	$\text{AGG}^- + \text{GG}^+ \rightarrow \text{AGG}^- + \text{GG}^-$ $\text{AGG}^- + \text{AG}^+ \rightarrow \text{AGG}^- + \text{AG}^-$ $\text{AGG}^- + \text{LG}^+ \rightarrow \text{AGG}^- + \text{LG}^-$ $\text{AGG}^+ + \text{GG}^- \rightarrow \text{AGG}^- + \text{GG}^-$ $\text{AGG}^+ + \text{AG}^- \rightarrow \text{AGG}^- + \text{AG}^-$ $\text{AGG}^+ + \text{LG}^- \rightarrow \text{AGG}^- + \text{LG}^-$	-14.3 -15.3 -15.7 -15.1 -14.2 -13.9	$\Delta V_{\text{ldp}} + \Delta V_{\text{ldp}} - \Delta V_{\text{ion}} = -15$
	7	$\text{AGG}^- + \text{AGG}^+ \rightarrow 2^+\text{AGG}^-$	-15.2	$2 \Delta V_{\text{ldp}} - \Delta V_{\text{ion}} = -16$

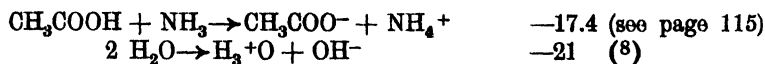
TABLE I (continued).  
G = Glycine; A = Alanine; L = Leucine; GG = Glycylglycine etc.

Reference	No.	R-action	$\Delta V$ found	$\Delta V$ calc.
(8)	8	$A^- + G^- \rightarrow A^- + G^-$	+ 1.0	0
(8)	9	$GG^- + G^- \rightarrow +GG^- + G^-$ $AG^- + G^- \rightarrow +AG^- + G^-$ $LG^- + G^- \rightarrow +LG^- + G^-$ $GG^- + A^- \rightarrow +GG^- + A^-$ $GG^- + A^- \rightarrow +AG^- + A^-$ $LG^- + A^- \rightarrow +LG^- + A^-$	+ 1.0 - 8.2 - 2.8 - 2.0 - 4.2 - 3.3 - 8.0	$\Delta V_{ldp} - \Delta V_{dp} = -2.5$
	10	$GG^- + AG^- \rightarrow +GG^- + AG^-$ $GG^- + LG^- \rightarrow +GG^- + LG^-$ $AG^- + LG^- \rightarrow +AG^- + LG^-$	- 0.9 - 1.2 - 0.8	0
(page 115) and (8)	11	$AGG^- + G^- \rightarrow +AGG^- + G^-$ $AGG^- + A^- \rightarrow +AGG^- + A^-$	- 8.8 - 4.8	$\Delta V_{ldp} - \Delta V_{dp} = -9.5$
	12	$AGG^- + GG^- \rightarrow +AGG^- + GG^-$ $AGG^- + AG^- \rightarrow +AGG^- + AG^-$ $AGG^- + LG^- \rightarrow +AGG^- + LG^-$	- 0.1 - 1.0 - 1.8	$\Delta V_{ldp} - \Delta V_{dp} = -1$
(page 115) and (8)	13	$G^- + NH_4^+ \rightarrow G^- + NH_3$ $A^- + NH_4^+ \rightarrow A^- + NH_3$	+ 5.0 + 6.0	$\Delta V_{dp} - \Delta V_{ion} = +5$
	14	$GG^- + NH_4^+ \rightarrow +GG^- + NH_3$ $AG^- + NH_4^+ \rightarrow +AG^- + NH_3$ $LG^- + NH_4^+ \rightarrow +LG^- + NH_3$	+ 1.8 + 2.7 + 8.0	$\Delta V_{ldp} - \Delta V_{ion} = +2.5$
	15	$AGG^- + NH_4^+ \rightarrow +AGG^- + NH_3$	+ 1.8	$\Delta V_{ldp} - \Delta V_{ion} = +1.5$
(page 115) and (8)	16	$G^- + H_2PCO_4^- \rightarrow +G^- + HPO_4^{2-}$ $A^- + H_2PCO_4^- \rightarrow +A^- + HPO_4^{2-}$	-25.9 -24.9	$\Delta V_{dp} + \Delta V_{ion}^2 = -26$
	17	$GG^- + H_2PCO_4^- \rightarrow +GG^- + HPO_4^{2-}$ $AG^- + H_2PCO_4^- \rightarrow +AG^- + HPO_4^{2-}$ $LG^- + H_2PCO_4^- \rightarrow +LG^- + HPO_4^{2-}$	-29.1 -28.2 -27.9	$\Delta V_{ldp} + \Delta V_{ion}^2 = -28.5$
(page 115)	18	$AGG^- + H_2PCO_4^- \rightarrow +AGG^- + HPO_4^{2-}$	-29.2	$\Delta V_{ldp} + \Delta V_{ion}^2 = -29.5$

i. e., the formation of this *ion pair* is accompanied by a contraction of 15.8 ml/mol. Similarly for the process



we obtain  $\Delta V = -17.4$  as a mean value between WEBER's figure and one determined in the present paper. Other values for the contraction accompanying ion pair formation are



The reaction which is most likely to represent the ion pair formation between amino acids and peptides:



is undoubtedly the second one between acetylglycine and glycine ethylester and we have therefore chosen the value  $\Delta V_{\text{ion}} = -17$  as representing the volume change accompanying the formation of all ion pairs of the amino acid and peptide type independent of the constitution of the uncharged groups combined with  $\text{NH}_3^+$  and  $\text{COO}^-$ . (The  $\text{NH}_4^+$ -ion makes an exception and will be treated later on). It is possible that this value is a little too low in the case of ion pair formation among higher peptides for which EDSALL<sup>12)</sup> has roughly estimated the value  $-20$ . But for lower peptides it agrees quite well with the experimental data.

On the basis of this figure and the dilatometric measurements by WEBER it is now possible to find the volume changes which accompany dipole formation in several cases. The procedure is quite trivial so we shall only give a single example:

According to WEBER<sup>8)</sup> the process



is accompanied by a volume change of  $-8.9$  ml/mol. Hence if by  $\Delta V_{\text{dp}}$  we denote the volume change accompanying the formation of an amino acid dipole (short dipole) we obtain:

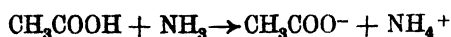
$$\begin{array}{l} 2 \Delta V_{\text{dp}} - \Delta V_{\text{ion}} = -8.9 \\ \text{and } \Delta V_{\text{dp}} = -12.95 \end{array}$$

The following rounded off values were determined in this way:

$\Delta V$ accompanying the formation of an amino acid dipole	$\Delta V_{\text{dp}}$	$= -13$
" " " " " a dipeptide dipole	$\Delta V_{\text{ldp}}$	$= -15.5$
" " " " " tripeptide dipole	$\Delta V_{\text{lldp}}$	$= -16.5$
" " " " " tetrapeptide and higher dipoles		
	(see below)	$\Delta V_{\text{ion}} = -17$
" in ion pair formation		$\Delta V_{\text{ion}} = -17$

It is observed that, in the amino acid, charges of opposite sign are so close to one another that their resulting influence upon the surrounding water molecules is smaller than that of an ion pair. The same is true in case of the dipeptide and tripeptide although it is apparent that with increasing length of the dipole the contraction approaches that for the ion pair<sup>(12)</sup>. Hence in the case of tetrapeptides and higher peptides we shall assume that the charges are situated so far from one another that they act as individual ions.

We may point out that the difference between the electrostriction of, say, short dipoles and ion pairs must depend upon the salt concentration of the medium, i. e., upon the mean distance between free positive and negative ions in the solution. Thus in 1 N KCL the process



is accompanied by a volume change of  $-15.4$  against  $-17.4$  in 0.1 N solution (see page 115). WEBER's data were found for 0.1 — 0.2 molar solutions and must be used with caution outside of this range of concentration.

TABLE II.

Substance	Electrostriction (quoted from (12))	here assumed
glycine .....	12.7	13.0
$\alpha$ -alanine .....	13.2	
serine .....	12.9	
$\alpha$ -amino isobutyric acid .....	11.5	
l-asparagine .....	15.3	
glycylglycine .....	16.1	15.5
glycylleucine .....	18.7	
leucylglycine .....	15.3	
glycylalanine .....	15.7	
alanylglycine .....	14.1	
glycylglycylglycine .....	16.1	16.5
leucylglycylglycine .....	16.3	

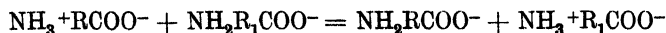
Table I, sections 1—7, shows the individual variations in the contraction accompanying a series of experimentally investigated reactions. It is observed that the deviations from the values calculated on the basis of our assumed values for  $\Delta V_{dp}$  etc. seldom exceed 1—2 ml/mol.

Table II allows a comparison with the electrostrictions recorded by Mc MEEKIN, COHN and WEARE<sup>10</sup>), GREENSTEIN and WYMAN<sup>11</sup>) and EDSALL<sup>12</sup>).

Also here the agreement is as good as could be expected, which indicates that our assumed value for  $\Delta V_{ion}$  is reasonable.

The above figures are sufficient for the calculations in the isoelectric zone where all the substances in question are present as amphotons. Outside of this zone however complications arise due to ionization of the peptides and their split products. If other buffers are added, their ionization must be taken into consideration too. Hence a number of additional data are required for the determination of the volume change at any ph and in any medium. Since in the experimental part experiments are recorded in which proteins are hydrolysed with trypsin and chymotrypsin at ph values around 6 — 9 we have centered our interest on the conditions in this ph interval. As buffers we have chosen mixtures of ammonia and ammonium chloride and of primary and secondary phosphate.

If no buffer is added and ph is regulated by means of NaOH we have only to deal with proton transfers from one amino acid or peptide to another according to the scheme:



In consequence of our previous generalizations we shall here assume *that the formation of all negative amino acid or peptide ions is accompanied by the same contraction*. The degree of accuracy with which this is fulfilled is seen from Table I, sections 8—12.

If ammonia is used as a buffer substance the proton transfer from ammonium ions to negatively charged amino acid or peptide ions or vice versa must be taken into consideration. Here again we shall assume *that the volume change,  $\Delta V_{ion}^1$  accompanying the formation of an ion pair consisting of an ammonium ion and a negative amino acid or peptide ion is the same in all cases, viz. —18.* (Table I, sections 13—15).

If finally phosphate is used as a buffer, the big contraction due to the formation of the divalent phosphate ion must be considered (see page 115).

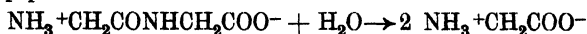
The value —13 was adopted *for the volume change  $\Delta V_{ion}^2$  accompanying the formation of a diphosphate ion with simultaneous disappearance of an amino acid or peptide anion and a monophosphate ion.*

The accuracy of this assumption is seen from Table I, section 16—18.

In strongly acid or alkaline solutions the proton transfer between  $H_3^+O$  and  $OH^-$  and the substances in question must be taken into consideration. We shall here refer to section A<sub>4</sub> in which the splitting of glycylglycine in the whole ph region from 0.5 to 13.5 has been investigated.

**2. The splitting of peptides in the isoelectric zone.** On the basis of the figures in the preceding section we are now able to calculate the volume change due to electrostriction in the isoelectric zone. The results are as follows:

*Splitting of dipeptides:*



(Disappearance of a long dipole, formation of two short ones)

$$\Delta V = 2 \Delta V_{dp} - \Delta V_{ldp} = -26.0 + 15.5 = -10.5.$$

*Splitting of one peptide bond in tripeptides:*



(Disappearance of a tripeptide dipole, formation of a long and a short dipole)

$$\Delta V = \Delta V_{dp} + \Delta V_{ldp} - \Delta V_{lldp} = -13.0 - 15.5 + 16.5 = -12.0$$

*Splitting of one peptide bond in tetrapeptides:*

1. A terminal bond (Disappearance of an ion pair, formation of a tripeptide dipole and a short dipole)

$$\Delta V = \Delta V_{dp} + \Delta V_{lldp} - \Delta V_{ion} = -12.5$$

2. The bond in the middle of the chain (Disappearance of an ion pair, formation of two dipeptide dipoles)

$$\Delta V = 2 \Delta V_{ldp} - \Delta V_{ion} = -14.0$$

*Splitting of one peptide bond in polypeptides*

1. A terminal bond (formation of a short dipole)

$$\Delta V = \Delta V_{dp} = -13.0$$

2. A bond next to a terminal bond (formation of a long dipole)

$$\Delta V = \Delta V_{ldp} = 15.5$$

3. A bond in the middle of the chain (formation of an ion pair)

$$\Delta V = \Delta V_{ion} = -17.0$$

### 3. The splitting of peptides in the ph range 6–10 with or without addition of buffers.

Our calculations of the contraction accompanying the splitting of peptides in this ph region were based upon the following trivial considerations. In the course of the hydrolysis a change in ph will occur in practically all cases except in the ideal one that infinite amounts of buffers are added. Only in the isoelectric zone this ph change is without significance for the ionization and consequently for the contraction. Outside of this range the change in ionization due to the change in ph must be considered. This was done in the following elementary way:

The mass action equation for any ampholyte may be written

$$\frac{c_{a-} \cdot c_H}{c_{+a-}} = K_a$$

and putting  $c_{a-} + c_{+a-} = c_{Ta}$  we obtain

$$c_{a-} = \frac{c_{Ta}}{1 + \frac{c_H}{K_a}} \quad \dots \dots \dots (9)$$

Similarly in a mixture of ampholytes we have

$$\Sigma c_{a-} = \Sigma \frac{c_{Ta}}{1 + \frac{c_H}{K_a}} \quad \dots \dots \dots (10)$$

If the ph of the ampholyte mixture is regulated by addition of base, say NaOH, and no buffer added, we must have

$$\Sigma \frac{c_{Ta}}{1 + \frac{c_H}{K_a}} = c_{Na+} = \text{constant} \quad \dots \dots \dots (11)$$

From this equation ph and the composition of the system in general may be calculated at any stage of the enzymatic process provided the values for  $K_a$  are known and the successive values for  $c_{Ta}$  are inserted. The following graphical method was used: Plotting  $\frac{c_{Ta}}{1 + \frac{c_H}{K_a}}$

against ph gives the well known S-shaped curve whose form is independent of  $K_a$  and whose midpoint is situated at  $\text{ph} = -\log K_a$ . Hence a number of templates were made corresponding to different values of  $c_{Ta}$  (e.g. for  $c_{Ta} = 0.2, 0.15, 0.1, 0.075, 0.05$  and  $0.025$ ) and the S-shaped curves were drawn for the different ampholytes (with their different values for  $-\log K_a$ ), inserting discrete values for  $c_{Ta}$ . The ordinates of these curves were added up and a new curve was found. The point of intersection of this curve with a line drawn parallel to the axis of abscissae and at a distance from this equal to  $c_{Na+}$  determines ph of the mixture and hence the concentrations of all the different components.

If ammonia-ammonium chloride buffer is added we have the equations

$$\frac{c_H \cdot c_{NH_3}}{c_{NH_4+}} = K_{NH_3} \quad \dots \dots \dots (12)$$

and

$$c_{NH_3} + c_{NH_4+} = c_{TNH_3} \quad \dots \dots \dots (13)$$

from which

$$c_{NH_4+} = \frac{c_{TNH_3}}{1 + \frac{K_{NH_3}}{c_H}} \quad \dots \dots \dots (14)$$

Hence for the ampholyte system we obtain

$$\Sigma \frac{c_{Ta}}{1 + \frac{c_H}{K_a}} = \frac{c_{TNH_3}}{1 + \frac{K_{NH_3}}{c_H}} + c_{Na+} - c_{Cl-} \quad \dots \dots \dots (15)$$

ph is here determined as the point of intersection between the S-shaped curve for ammonia and the curve obtained by adding up  $c_{Na+}$ ,  $c_{Cl-}$  and the ordinates of the curves for the ampholytes. If phosphate buffer is added we obtain

$$\Sigma \frac{c_{Ta}}{1 + \frac{c_H}{K_a}} = - \frac{c_{TP}}{1 + \frac{c_H}{K_P}} + c_{Na+} \quad \dots \dots \dots (16)$$

in which  $c_{Na+}$  is the concentration of NaOH added as such, plus one half of the concentration of secondary phosphate.

In the following rough calculations the values given below were introduced (compare COHN<sup>14</sup>):

Amino acid	$pK_a$	9.4	(30°)	Polypeptide	$pK_a$	7.6	(30°)
Dipeptide	$pK_a$	8.0	"	Ammonia	$pK_{NH_3}$	9.0	"
Tripeptide	$pK_a$	7.8	"	Phosphate	$pK_P$	6.8	"
Tetrapeptide	$pK_a$	7.7	"				

Fig. 1 may serve as an illustration of the graphical method and the calculation of  $\Delta V$  as a whole.

A dipeptide (glycylglycine, gg) is assumed to be present initially in a concentration of 0.1 m (initial  $c_{Tgg}$ ). We wish to determine the average contraction per mol peptide bond split during the hydrolysis of 50 per cent of the peptide. Hence the final peptide concentration is 0.05 m (final  $c_{Tgg}$ ) while that of glycine (final  $c_{Tg}$ ) is 0.1 m. The glycine curve is set off below the zero line in order to make the figure a little clearer.

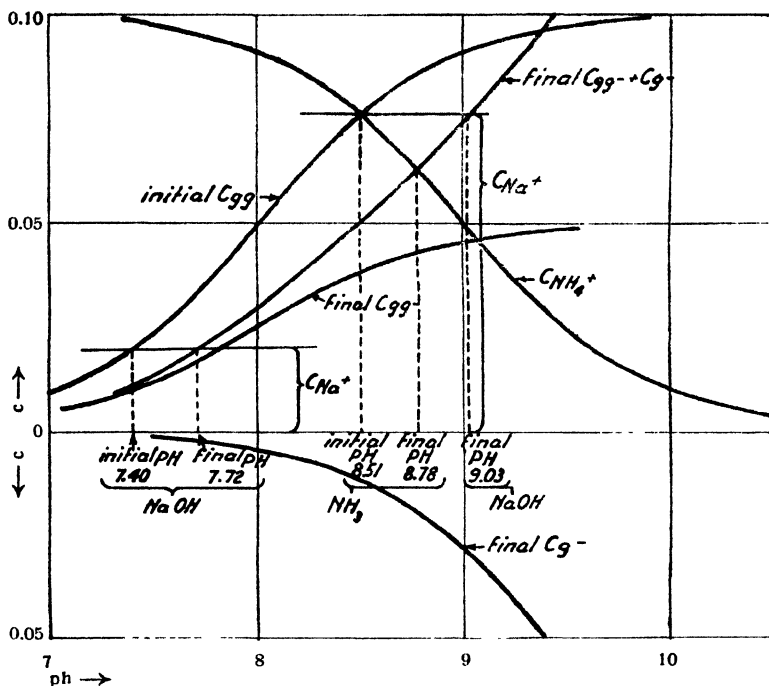


Fig. 1.  
Hydrolysis of a dipeptide (gg) into two amino acids (g).

*Initial ph 7.4.* If ph is regulated by means of NaOH this initial ph corresponds to  $c_{Na+} = 0.02$ . The line parallel with the axis of abscissae intersects the curve representing  $c_{gg-} + c_{g-}$  at 50 per cent hydrolysis in a point the abscissa of which is  $ph = 7.72$  (final ph). Hence we have:

Initially:	$c_{gg-} = 0.020$ ;	$c_{gg} = 0.080$ ;	$c_{Tgg} = 0.1$
finally:	$c_{gg-} = 0.0175$ ;	$c_{gg} = 0.0325$ ;	$c_{Tgg} = 0.05$
	$c_{g-} = 0.0025$ ;	$c_g = 0.0975$ ;	$c_{Tg} = 0.1$

Increase in conc. of ions:  $-(c_{gg-})_{init} + (c_{gg-} + c_{g-})_{fin} = -0.020 + 0.0175 + 0.0025 = 0$

Increase in conc. of dipeptide dipoles:  $-(c_{gg})_{init} + (c_{gg})_{fin} = -0.080 + 0.0325 = -0.0475$

Increase in conc. of amino acid dipoles:  $(c_g)_{fin} = 0.0975$

$$\Sigma \Delta V = (+0.0975 \Delta V_{dp} - 0.0475 \Delta V_{ldp}) \cdot \frac{1}{0.05} = -10.6$$

*Initial ph 8.51. NaOH alone.*

$$c_{Na+} = 0.076, \text{ final ph } 9.03.$$

Initially:	$c_{gg-} = 0.076$ ;	$c_{gg} = 0.024$
finally:	$c_{gg-} = 0.046$ ;	$c_{gg} = 0.004$
	$c_{g-} = 0.0295$ ;	$c_g = 0.0705$

Increase in conc. of ions:  $-(c_{gg-})_{init} + (c_{gg-} + c_{g-})_{fin} = -0.076 + 0.046 + 0.0295 = 0$

Increase in conc. of dipeptide dipoles:  $-(c_{gg})_{init} + (c_{gg})_{fin} = -0.024 + 0.004 = -0.020$

Increase in conc. of amino acid dipoles:  $(c_g)_{fin} = 0.0705$

$$\Sigma \Delta V = (+0.070 \Delta V_{dp} - 0.020 \Delta V_{ldp}) \cdot \frac{1}{0.05} = -12.0$$



Initial ph 8.51  $\text{NH}_3$  alone,  $c_{\text{TNH}_3} = 0.1 \text{ m}$

Final ph 8.78

Initially:	$c_{\text{gg}^-} = 0.076$ ;	$c_{\text{gg}} = 0.024$ ;	$c_{\text{NH}_4^+} = 0.076$
finally:	$c_{\text{gg}^-} = 0.048$ ;	$c_{\text{gg}} = 0.007$ ;	$c_{\text{NH}_4^+} = 0.0685$
	$c_{\text{g}^-} = 0.0195$	$c_{\text{g}} = 0.0805$	

Increase in conc. of ion pairs:

$$\frac{1}{2} (-0.076 + 0.048 + 0.0195 - 0.076 + 0.0685) = -0.013$$

Increase in conc. of dipeptide dipoles:

$$-0.024 + 0.007 = -0.017$$

Increase in conc. of amino acid dipoles: 0.0805

$$\Sigma \Delta V = (+0.0805 \Delta V_{\text{dp}} - 0.017 \Delta V_{\text{Idp}} - 0.013 \Delta V_{\text{ion}}) \frac{1}{0.05} = -11.0$$

Initial ph 8.51. Conc. of ammonium chloride- ammonia buffer =  $\infty$ ; final ph 8.51.

Initially:	$c_{\text{gg}^-} = 0.076$ ;	$c_{\text{gg}} = 0.024$ ;
finally:	$c_{\text{gg}^-} = 0.088$ ;	$c_{\text{gg}} = 0.012$ ;
	$c_{\text{g}^-} = 0.012$ ;	$c_{\text{g}} = 0.088$ ;

Increase in conc. of ion pairs:  $(-c_{\text{gg}^-})_{\text{init}} + (c_{\text{gg}^-} + c_{\text{g}^-})_{\text{fin}} = -0.026$

Increase in conc. of dipeptide dipoles:  $-0.024 + 0.012 = -0.012$

Increase in conc. of amino acid dipoles: 0.088

$$\Sigma \Delta V = (0.088 \Delta V_{\text{dp}} - 0.012 \Delta V_{\text{Idp}} - 0.026 \Delta V_{\text{ion}}) \frac{1}{0.05} = -9.8$$

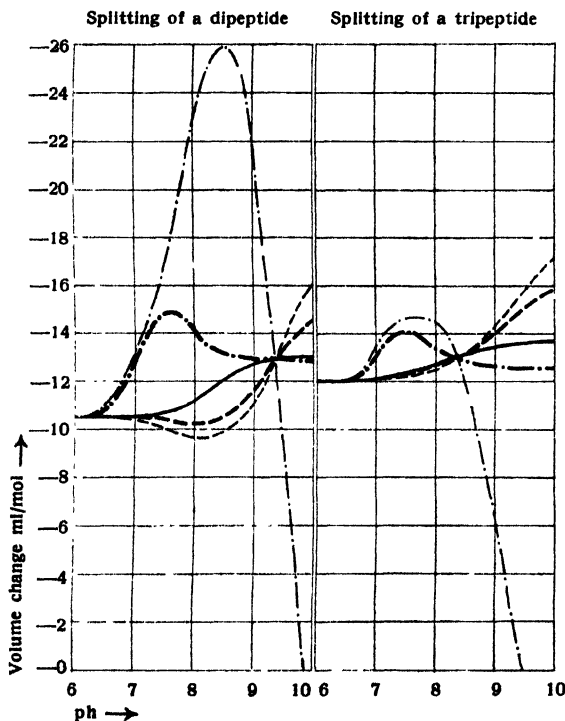


Fig. 2.

The curves in Figs. 2, 8 and 4 were calculated in this way: The ordinates are the average volume change (per mol peptide bond split) during the splitting of 50% of the peptides in question. The abscissae are the initial ph values. The initial concentration of peptide was chosen as 0.1 m, but within the limits of the validity of WEBER's figures the results are independent of the absolute concentrations of peptides and buffers.

————— ph regulated with NaOH.  
 - - - - - ph regulated with NaOH and  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_3$  buffer (0.2 m) Ratio between buffer and initial peptide conc.  $c_{\text{TNH}_3}/c_{\text{Ta}} = 2$   
 . . . . . ph regulated with  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_3$  buffer at infinite concentration Ratio between buffer and initial peptide conc. =  $\infty$   
 . - - - . ph regulated with NaOH and 0.2 m phosphate buffer ( $c_{\text{TP}} = 0.2$ ) Ratio between buffer and initial peptide conc.  $c_{\text{TP}}/c_{\text{Ta}} = 2$   
 . . . . . ph regulated with phosphate buffer at infinite concentration Ratio between buffer and initial peptide conc. =  $\infty$

To give an idea of the variation of  $\Delta V/\text{mol}$  during the process of hydrolysis this quantity was calculated for 25, 50, 75 and 100 per cent hydrolysis of di- tri- and tetrapeptides at pH 8, the pH adjustment being made with NaOH, only. The results are seen in table III and may be regarded as representing the worst possible case since the variation during hydrolysis is always smaller when extra buffers are added.

TABLE III.  
Change in  $\Delta V/\text{mol}$  during hydrolysis.  
pH 8. NaOH.

per cent hydrolysis	dipeptide	tri-peptide	tetra-peptide (in the middle)
25	-10.8	-12.6	-15.3
50	-11.1	-12.7	-15.1
75	-11.5	-12.7	-15.1
100	-11.8	-12.8	-15.0

A few explanatory remarks concerning Fig. 2-4 may not be superfluous.

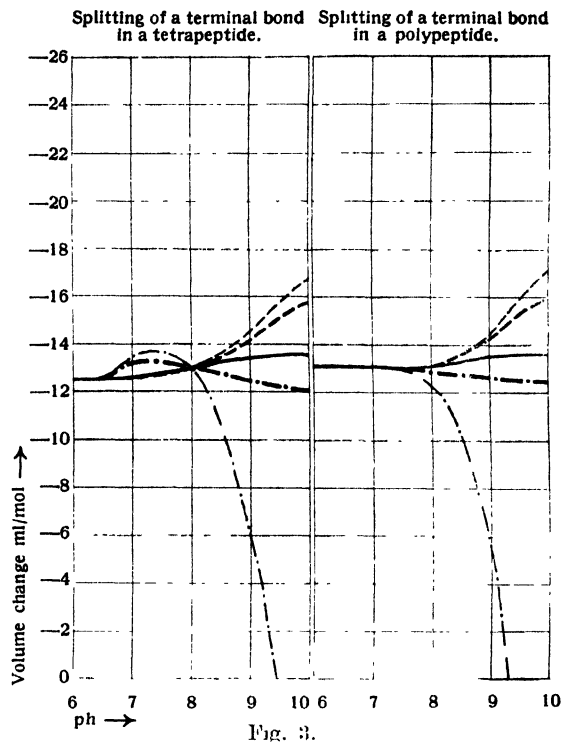


Fig. 3.

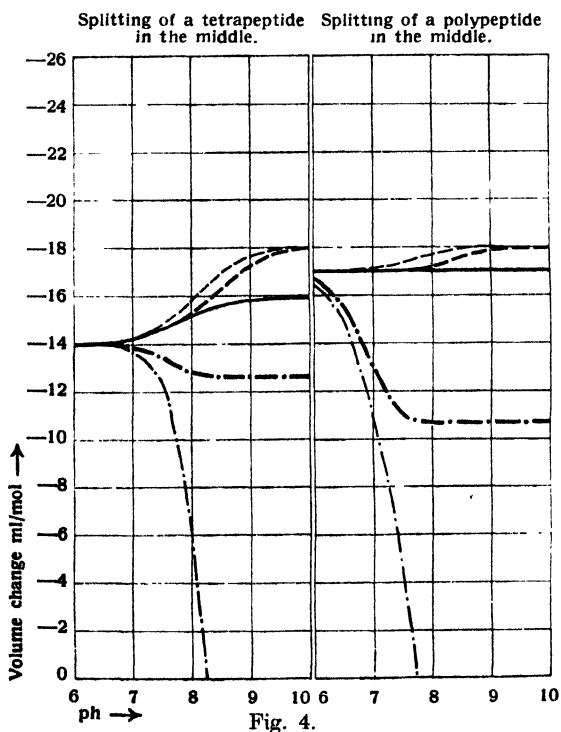


Fig. 4.

The hydrolysis of a dipeptide (Fig. 2) is, on the acid side of 9.36 \*), accompanied by an increase in pH. This is due to the high  $p_K$  value of the amino acid as compared to that of the peptide. The disappearance of peptide anions due to hydrolysis must be compensated by an ionization of the residual peptide since the amino acid formed is but slightly ionized. In ammonia buffered solutions this increase in pH causes a de-ionization of  $\text{NH}_4^+$  (dotted curves) and hence the contraction found here is lower than in the solutions without foreign buffers. In phosphate buffered systems the rise in pH causes a formation of divalent phosphate ions and an increase in the calculated contraction.

On the alkaline side of pH 9.35 a fall in pH is observed during the hydrolysis because the ionization of the amino acid is now so pronounced that an

\*) Assuming the values for  $p_K$  given on page 104.

excess of ions appear which must be compensated by a de-ionization of the ampholytes present. Hence in ammonia buffered solutions a higher contraction, and in phosphate buffered solutions a lower contraction is found than in the unbuffered systems. At finite phosphate buffer concentrations the effect is small because we are far outside of the range of this buffer, but at infinite buffer concentration a very great effect is observed, so great actually that a dilatation occurs above ph 9.8. This is an ideal case it is true, but it serves to show the ultimate effect of phosphate upon the contraction.

The above considerations are valid also for the splitting of tripeptides and of terminal bonds in tetrapeptides, only the ph values at which the ph variation changes its sign are lying at 8.89 and 8.06, respectively. The effects are smaller here because the substances split are more like those which are formed. In the three residual cases however, (splitting of terminal bonds in polypeptides and of bonds in the middle of the chain) the situation is changed in that the hydrolysis always is accompanied by an increase in ph. The difference between the  $p_K$  values for the peptides and their split products is so small that in all cases an excess of ions will appear during the hydrolysis. Since in the systems, Fig. 4, the range of ionization of all the ampholytes is close to the buffer range of the phosphate we find here a strong depression of the contraction even in systems buffered with finite concentrations of phosphate. Table IV shows the magnitude of the ph displacement during hydrolysis in three characteristic cases.

TABLE IV.

ph displacement during 50 per cent hydrolysis of a dipeptide, tripeptide and polypeptide (in the middle). ph regulated with NaOH only.

Initial ph	$\Delta$ ph		
	Dipeptide	Tripeptide	Polypeptide
7	0.30	0.07	-0.22
7.5	0.33	0.07	-0.27
8	0.52	0.08	-0.44
8.5	0.54	-0.06	-0.72
9	0.31	-0.34	-1.13
9.5	-0.09	-0.74	-1.60
10	-0.58	-1.23	-2.03

the longest dipoles causes the highest contraction and since they disappear in the reaction while shorter dipoles appear, the dilatation due to disappearance of long dipoles will, with increasing ph, become less and less significant in comparison with the contraction due to formation of short dipoles. (It will be remembered that the sum of the concentrations of negative ions is constant throughout the reaction (equation (9)).

If ammonia buffer is present we have the further possibility of ion pair formation at ph values higher than that at which the ph displacement is zero. In consequence hereof all the curves for systems buffered with infinite amounts of ammonia buffer tend towards the value -18.0 which will be reached at ph values where all dipoles are completely ionized.

In all these calculations no account was taken of the dilatation due to de-ionization of hydroxyl ions during the hydrolysis in the more alkaline solutions. Since however an initial ph value of 10 corresponds to an OH concentration of 0.0001 the highest possible dilatation originating from this process will be  $25.7 \frac{0.0001}{0.05} = 0.05$  ml/mol (see below) and may therefore be disregarded.

**4. Comparison with previous experiments. Dipeptide splitting in the whole ph region from 0.5 to 13.5.** The only previous investigations which may be directly compared with the above calculations are those by RONA and FISCHGOLD<sup>1)</sup> and LINDERSTRØM-LANG and LANZ<sup>6)</sup>. The former authors determined the contraction accompanying the hydrolysis

The rise in contraction towards greater alkalinity which is observed in all ammonia and phosphate free systems except the last one (Fig. 4 to the right) may be understood on the following basis:

If ph is regulated with NaOH, the determining factor is the connection between chain length and  $p_K$  value. The longest dipoles have the smallest  $p_K$  values (see page 104) and hence with increasing ph they will be ionized (i.e. decrease in relative concentration) before the short dipoles.

At the same time the formation of

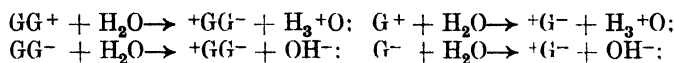
of glycylglycine, alanylglycine and glycylalanine in strong acids and bases. The measurements were not of the highest accuracy since glycyl peptides behave abnormally in VAN SLYKES method for amino group determination which was used for following the chemical change. Furthermore the concentrations used (1.5 N NaOH, concentrated HCl) were so high that a comparison with figures based upon WEBER's measurements is difficult. Still, we have thought it of value to calculate the dipeptide contraction in a broad pH region to show the effect of proton transfers between  $H_3^+O$ ,  $OH^-$  and the reacting substances. The curve in Fig. 5 which shows the results is calculated in a different and easier way than the previous curves, the ordinates being the *initial* contraction (ml/mol) calculated by means of the equations:

$$\Delta V = -9.2 \cdot \frac{dc_{gg+}}{dc_{\tau gg}} - 7.1 \cdot \frac{dc_{g+}}{dc_{\tau gg}} - 10.5 \quad (\text{acid side of the isoelectric zone})$$

and

$$\Delta V = -25.7 \cdot \frac{dc_{gg-}}{dc_{\tau gg}} - 23.6 \cdot \frac{dc_{g-}}{dc_{\tau gg}} - 10.5 \quad (\text{basic side of the isoelectric zone})$$

in which the figures  $-9.2$ ,  $-7.1$ ,  $-25.7$  and  $-23.6$  are the volume changes in the processes:



(WEBER<sup>8</sup>).

The differential quotients were found from equations such as (9), putting  $c_{\tau g}$  (total concentration of glycine) equal to zero after differentiation.

It appears from this curve that on both sides of the isoelectric zone there is a distinct rise in the contraction, which is to be explained in a similar way as in the preceding section. The rise is however followed by an abrupt decline due to reactions with  $OH^-$  and  $H_3^+O$ . These ions exert their maximal influence in the initial step of the hydrolysis because the fall in pH in the alkaline region (de-ionization of  $OH^-$ ) and the corresponding rise in pH in the acid region (formation of  $H_3^+O$ ) is much more pronounced at the beginning of the hydrolysis. Hence in Fig. 5 the decline sets in at lower pH values than if the average volume change during 50 per cent hydrolysis had been calculated (Fig. 2).

At very low and very high pH values the curve approaches the values  $-5.5$  and  $+11.0$  respectively, while RONA and FISCHGOLD<sup>1</sup> find the values  $-2.5$  and  $+9.0$  in strong acid and base respectively. If the volume change due to the water addition and the breaking of the peptide bond (compare page 98) is assumed to be independent of pH, the differences

$$\begin{aligned} -5.5 - (+11.0) &= -16.5 \\ \text{and } -2.5 - (+9.0) &= -11.5 \end{aligned}$$

ought to be the same. RONA and FISCHGOLD who have made a similar comparison themselves explain the discrepancy as being due to experimental errors. An alternative explanation would be that there is a considerable salt effect which renders the comparison with WEBER's figures uncertain.

A more direct comparison of this kind can be made in case of the dilatometric determinations by LINDERSTRÖM-LANG and LANZ<sup>6</sup>). Table V shows some calculations of the volume change in phosphate buffered dipeptide solutions. The calculated volume changes in Table VI were found from these figures by graphical interpolation. The found values are taken from the above quoted paper. The differences found—calculated, i.e., the volume change due to water addition and scission of the peptide bond, agree extremely well considering the assumptions made in

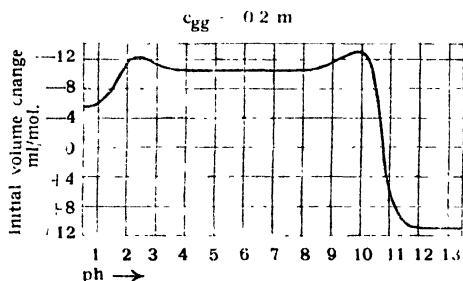


Fig. 5. Volume change accompanying dipeptide splitting.

the calculations and the experimental errors in the dilatometric determination (e.g., due to buffer substances introduced together with the enzyme solution, the presence of glycerine <sup>(6)</sup> and so on).

TABLE V.

Average volume change ml/mol and total ph displacement during 50 per cent hydrolysis of a dipeptide at different ph and phosphate concentration. Initial concentration of dipeptide: 0.1 m.

phosphate conc.	initial ph 6.8		initial ph 7.4		initial ph 8.0	
	$\Delta\text{ph}$	$\Delta V$	$\Delta\text{ph}$	$\Delta V$	$\Delta\text{ph}$	$\Delta V$
0	0.23	-10.56	0.33	-10.60	0.53	-11.07
0.0125	0.13	-11.11	0.29	-11.38	0.52	-11.33
0.025	0.09	-11.45	0.26	-11.80	0.50	-11.61
0.0375	0.07	-11.53	0.23	-12.30	0.49	-11.88
0.050	0.05	-11.60	0.19	-12.59	0.47	-12.16

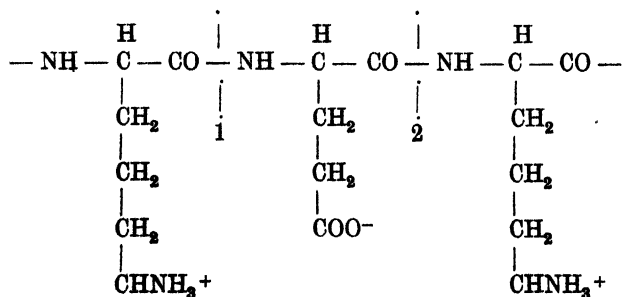
TABLE VI.

Average volume change during 50 per cent hydrolysis of alanylglycine at different ph and phosphate concentration. Initial concentration of alanylglycine: 0.1 m.

Initial ph	Phosphate conc.	$\Delta V$		found — calc: volume change due to water addition and scission of the peptide bond
		found (6)	calc.	
6.8	0.0167	-9.2	-11.3	+ 2.1
7.4	0.0088	-9.1	-11.2	+ 2.1
7.4	0.0167	-9.4	-11.5	+ 2.1
7.4	0.0333	-9.9	-12.1	+ 2.2
8.0	0.0167	-9.4	-11.4	+ 2.0

### B. Splitting of peptides with charged side chains.

If the results of the calculations in the foregoing section shall be applied to the problem of the cleavage of proteins it is necessary to say a few words about the possible influence upon the contraction of other charges than the terminal ones. It is quite clear that the presence of other charges belonging to ionogen groups in the amino acid residues will produce an additional effect. Thus in a peptide built up by lysine and glutamic acid alternately;



we must expect that an additional contraction will accompany the scission of the peptide bond 2 due to the simultaneous separation of the  $\text{NH}_3^+$  and  $\text{COO}^-$  groups, and the formation of two

doubly charged ions. In case of the splitting of bond 1 the effect will be much smaller because two dipoles are formed here. Similarly it might be expected that chains containing pairs of positively charged residues (such as in clupein (see later)) will show a reduced contraction. Everything depends here upon the distance between such side chain ion pairs, a question to which we are not able to contribute much. It may however be safe to point out that these effects cannot be large. We have seen that the contraction accompanying the formation of an amino acid dipole is around 18 ml/mol, *i.e.*, 4 ml/mol smaller than that accompanying an ion pair formation. On the other hand the dipole moment of glycine is  $20 \cdot 10^{-18}$  <sup>(15)</sup> corresponding to a distance of 4 Ångström between the charges. Hence considering that the ions in the above peptide may move about 15 Ångström apart, that they have a very slight tendency to association and are comparatively unrestricted in their thermic movement, we may feel safe to conclude that their average distance is greater than that of the ions in glycine \*). We can therefore hardly expect more than a couple of ml/mol of additional contraction to originate from this source.

In section A it was found that the highest possible contraction in connection with the hydrolysis of polypeptides was 17–18 ml/mol. The above effects may raise it to a little above 20. In these figures is not included the volume change accompanying the water addition and the breaking of the bond, but as mentioned above this volume change is probably small and may even be of the opposite sign. If therefore considerably higher contractions are found at the splitting of proteins by enzymes it would indicate the presence of special structures in these substances. We shall return to this question in the following.

In connection with these considerations we may call attention to the buffer effect of the ionogen groups in the amino acid residues. In the above treatment the buffer effect of the terminal  $\text{NH}_3^+$  groups (and  $\text{COO}^-$  groups (Fig. 5)) was included in the calculations and played a dominant role in the determination of  $\Delta V$  outside of the isoelectric zone. Amino groups in the amino acid residues, will of course have a similar effect but this effect will be closely comparable to that of ammonia or other foreign buffers of this type (WEBER <sup>8</sup>) and consequently it is unable to change the general picture given in figures 2–4. Residual carboxyl groups may have a slight diminishing effect upon the contraction in the pH region 6–7, but in general it must be emphasized that the maximal contraction given for the hydrolysis of polypeptides is but insignificantly influenced by these factors.

### C. Splitting of Proteins.

As mentioned in the introduction comparatively few dilatometric investigations on proteins are found in the literature, and unfortunately most of them were made under such conditions that no definite conclusions can be drawn from the results. The experiments by RONA and FISCHGOLD <sup>2</sup>) dealt with the volume change accompanying the hydrolysis of ovalbumin and caseinogen by pepsin and by alkali and in both cases the medium in which these processes proceed is destructive to other groups than peptide bonds. In the investigations by SREENIVASAYA and coworkers <sup>3, 4</sup>) the tryptic digestion of caseinogen and gelatine was studied but since phosphate buffer of pH 7.7 was used (in unstated concentration) it is evident from the foregoing chapters that the values found (–10.8, –8.7 ml/mol) must be too low due to the transformation of  $\text{HPO}_4^{--}$  to  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  during the hydrolysis. We have therefore carried out a series of investigations in which either no buffer or  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer was added, an experimental procedure which seems to us to secure the simplest possible results. The hydrolysis of clupein by crystalline trypsin and chymotrypsin was studied at pH 6 (no buffer) and pH 8 (0.1 M  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer) and that of lactoglobulin at pH 8 (0.1 M  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer). The results are summarized in Fig. 6 the volume change per mol peptide bond split being plotted against the average number of peptide bonds split per protein molecule (see page 118).

\*) In the case of adjacent charges of the same sign such as in clupein the mean distance will be much larger and the effect correspondingly reduced.

It appears from this figure that clupein which was chosen as a representative of proteins with peptide chain structure (16, 17) shows a contraction per bond split which altogether falls below the upper limit given in the preceding chapters for the splitting of peptides. If anything the contraction is a little low for a polypeptide but that may easily be compensated by assuming a suitable positive value for the volume change accompanying the water addition and breaking of the bonds (page 98). The separation of the aggregation of positive charges found in this protein may also tend to diminish the contraction a little.

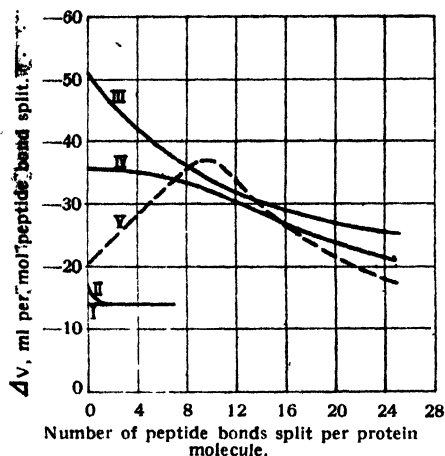


Fig. 6. I. Clupein, chymotrypsin.  
II. Clupein, trypsin.  
III. Lactoglobulin, chymotrypsin.  
IV. Lactoglobulin, trypsin.  
V. Denatured lactoglobulin, trypsin (Denaturation at pH 3)

Curve II represents experiments carried out at pH 6 as well as pH 8, the contraction — hydrolysis curves being nearly identical in these two cases (Fig. 11 and 12). This is again understood on the basis of the previous curves (Fig. 4 to the right). The decrease in contraction during hydrolysis is more difficult to explain in terms of electrostriction. Clupein contains around 28 peptide bonds in its molecule and hence the breaking of 2–3 bonds would lead to octa- or heptapeptides as an average, i.e., to peptides which hardly are short enough to show a decrease in contraction. At the same time we know too little about the contraction accompanying the hydrolysis itself (water addition and breaking of the bond) a quantity which may vary considerably from peptide bond to peptide bond depending upon chain length and adjacent groups. It is therefore premature to discuss this question at any length. We may further add that the effect is

of the order of magnitude of the experimental error of the methods used (page 114), this error being especially heavy in the initial stages of the hydrolysis. Curve I shows no such decrease and since it is quite likely that the splitting of clupein by chymotrypsin is actually effected by an impurity of trypsin, (the rate of reaction being about 400 times smaller than that of trypsin) further experiments with improved technique are required to decide this question definitively. Everything considered however, there is no doubt that clupein in these experiments behaves quite normally as a peptide, which is in good agreement with previous investigations (16, 17).

The curves representing the splitting of lactoglobulin are essentially different. We have here volume effects which are quite incompatible with those calculated for peptides. The contraction accompanying the splitting of the first bonds in the protein molecules is much too high and especially so in case of the splitting by chymotrypsin.

Several explanations of this peculiar phenomenon may be considered:

a. Experimental errors; e.g., incomplete determination of the groups (amino or carboxyl groups) set free in the enzymatic process or errors in the determination of the initial volume changes in the dilatometer (volume changes caused by heat phenomena accompanying the process of mixing enzyme and substrate).

b. Spontaneous destructive processes accompanied by marked contractions but not by liberation of such groups as are determined in the chemical analysis.

c. Enzymatic processes of the same type.

As regards the sources of error mentioned under a, we feel confident that they may be disregarded. We refer here to the experimental part in which the question has been touched upon (pages 117 and 118). To our opinion the interest must be centered either upon b or c and although it seems premature to elaborately discuss the possible processes, a few remarks may not be out of place. First of all it may be practical to distinguish between secondary and primary

destructive processes. The enzymatic process itself gives rise to a secondary destructive process. The scission of the peptide bonds which is chemically measured as an increase in carboxyl groups (or amino groups) produces of course a deepgoing destruction of the highly organized protein molecule. If for a moment we adopt the picture of the rolled-up peptide chain, this chain will be split to form shorter peptides and the residual linkages which served the purpose of stabilizing the original molecular structure either remain intact as linkages between the fragments or are spontaneously broken, all depending upon their nature and strength. The S-S linkages will undoubtedly belong to the former class while probably such linkages as „salt linkages” (SPEAKMAN) and hydrogen bonds will be spontaneously disrupted. It cannot be excluded that volume changes may accompany processes of this kind but the ultimate effect originating from these sources can only be determined if the number of such linkages per protein molecule is known and hence for this reason alone we must refrain from estimating the effect of the disruption of hydrogen bonds. In the case of salt linkages we know more about the possible number which is of the order of magnitude of 20 (the number of residual aminium groups or carboxyl groups) and if the term means nothing but the mutual attraction between two oppositely charged ions (being separately in equilibrium with the hydrogen ions of the medium) the problem is actually related to that discussed on page 111 *viz.* the problem of the influence of residual charges upon the contraction. In the form in which it was considered there this influence seemed unsuitable as a basis for explaining our experimental results, but it must be remembered that in a straight peptide chain we have only to reckon with the separation of one residual ion pair per peptide bond split while in a rolled-up peptide chain or in an aggregate of peptide chains several ion pairs may be released from their mutual contact by the scission of one peptide bond. This idea (which was put forward by Dr. EDSALL in a discussion with one of the authors) can hardly be entirely excluded but for the following reason it seems less likely in the present case: The total contraction per lactoglobulin molecule after the splitting of 30 bonds by chymotrypsin is 950 ml. If we assume that the actual contraction accompanying the splitting of these 30 bonds is as high as  $25 \times 30 = 750$  ml we get an excess contraction of 200 ml which distributed over 20 ion pairs gives 10 ml to each, a quite unlikely value. In addition it must be remembered that part of the residual aminium groups are de-ionized at pH 8 thus, *e.g.*, the histidine groups.

As primary destructive processes on the other hand we may consider such processes as must take place prior to the scission of the peptide bonds, in other words chemical changes which prepare the protein for the attack of the peptide bond splitting enzymes. Primary destructive processes may be spontaneous or may be catalyzed by non-identified components of the crystalline enzyme system applied. As regards spontaneous processes those involved in the denaturation of proteins must be considered first of all. It is a well known fact that denaturation of a protein results in an increased rate of hydrolysis by proteinases. It was furthermore shown <sup>(18)</sup> that a distinct fall in activation energy accompanied the rise in rate and the possibility was pointed out that peptide bonds may „appear” upon denaturation just as thiol groups „appear” (compare <sup>(19)</sup>). If therefore the chemical changes involved in denaturation transform the protein molecule so that peptide chains „appear” it was to be expected that the contraction per peptide bond split would fall. This idea was tested

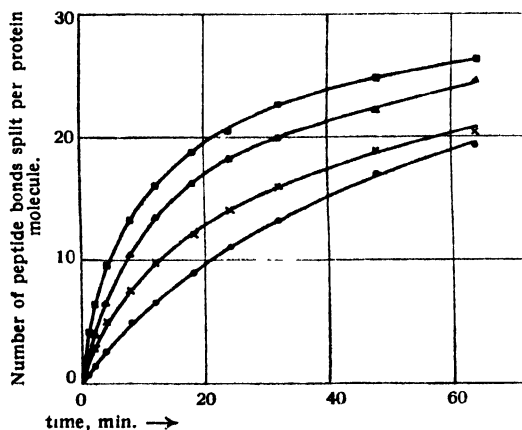


Fig. 7. Rate of splitting of lactoglobulin by trypsin.

- genuine lactoglobulin.
- △ × lactoglobulin denatured at pH 8.
- lactoglobulin denatured at pH 3.



with lactoglobulin denatured at pH 8 and pH 8 at which pH values no flocculation occurs. The experiments gave no quantitatively consistent results, but qualitatively they showed a considerably lower initial value for the contraction accompanying the splitting by trypsin (curve V, Fig. 6). The simultaneous rise in rate is seen from Fig. 7 (compare also Fig. 15). However, the initial fall was followed by a rise in contraction above that characteristic of the genuine protein at the same stage of the decomposition so whatever peptide-like compounds are formed in the denaturation the structural peculiarities which cause the high contraction are not effaced but remain in other molecules or in other parts of the molecule. This was perhaps to be expected because the volume change accompanying the denaturation of proteins is only slight (see (20) and (21)) and hence the average contraction over the complete hydrolysis of a protein must be nearly the same for genuine and denatured molecules; but it is certainly not in favour of the assumption that the eventual primary processes causing the high contraction are exclusively such as are involved in ordinary denaturation. In this connection it is interesting to observe that the splitting by chymotrypsin is but little influenced by a preceding denaturation (Fig. 17, initial part of the curves as compared with Fig. 15).

Naturally, the question cannot be solved on the basis of the limited material presented here. It is premature to postulate the existence (and presence in the enzyme preparations used) of substances which are catalytically active in the break-down of other structures in the proteins than peptide-like structures. But the experiments undoubtedly show that attempts to adjust the results obtained to the classical peptide chain theory meet with considerable difficulties.

### III. Experimental part.

**A. Materials.** *Glycine ethylester hydrochloride*. Prepared at the Carlsberg Laboratory several years ago. Recrystallized from alcohol. Theoretical base consumption in alcohol before and after recrystallization.

*Alanylglycylglycine*. Prepared in the laboratory according to E. FISCHER. Theoretical acid and base consumption in acetone and alcohol respectively.

*Chupein salts*. The sulphate was prepared according to KOSSEL (22) and converted into the chloride as described by RASMUSSEN and LINDERSTRØM-LANG (23).

*Lactoglobulin*. Prepared according to PALMERS method (24) as modified by SØRENSEN and SØRENSEN (25). Recrystallized three times.

*Trypsin and chymotrypsin*. Prepared according to KUNITZ and NORTHROP (26).

**B. Some determinations of the volume change accompanying proton transfers in aqueous solutions.** The two-bulb dilatometer used in these determinations is described elsewhere (6, 27). The two solutions the reaction of which was to be measured were introduced into the two bulbs, kerosene was filled in, the calibrated capillary tube inserted and the dilatometer immersed into a water-bath at  $20^\circ \pm 0.003$ . After attainment of temperature equilibrium the position of the meniscus was read during a period of 15 minutes. After mixing the two solutions the reading was continued for 30 minutes. The difference between the mean values of the two sets of readings (which should not deviate more than  $0.05 \mu\text{l}$  from the individual readings) was taken as the volume change accompanying the reaction in question. Care was taken that the pH value of the solutions (unmixed or mixed) was lying between 4 and 10 so that reactions between  $\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{OH}^-$  could be neglected. Exceptions were systems in which  $\text{H}_2\text{O}$  was one of the reactants. Here pure 0.1 N HCl was used as one of the solutions while the pH value of the other solution was kept below 10. If pH of the mixture was below 4 as in the case of alanylglycylglycine a correction for the remaining hydrogen ions was introduced. Table VII shows the results and needs no further explanation. As regards the theoretical side of the question we refer to WEBER and NACHMANN (7, 8).

**C. Enzymatic experiments.** In the enzymatic experiments the enzyme and substrate solutions, 10 ml of each, were placed in the two bulbs of the dilatometer. pH and buffer concentration of both solutions were the same in order to reduce the volume changes due to the mixing as much as possible. The water bath in which the dilatometer was placed had the temperature  $30^\circ \pm 0.001$  and the periodical volume change shown by control dilatometers was  $0.02 \mu\text{l}$ .

In each experiment such a control dilatometer containing inactivated enzyme, but otherwise having an identical filling was placed in the vicinity of the dilatometer containing the reaction mixture. The contents of the bulbs of the two dilatometers were mixed and the positions of the menisci were read with a difference in time of 10 sec. Readings were made at intervals for 1–2 hours. The figures obtained by subtracting the differences between these two sets of readings from the difference

TABLE VII.

Reaction	Solution 1	Solution 2	$\Delta V$ $\mu l$	$\Delta V$ ml/mol
$NH_3 + H_3^+O \rightarrow NH_4^+ + H_2O$	10 ml 0.1 N HCl	10 ml 0.24 N $NH_3$ + 5 ml 0.1 N HCl	— 6.82	— 6.8
$NH_3 + HOOCCH_2 \rightarrow$ $NH_4^+ + -OOCCH_2$	5 ml 0.102 N $CH_3COOH$ + 5 ml 0.100 N $CH_3COONa$	5.5 ml 0.24 N $NH_3$ + 5 ml 0.1 N HCl	— 8.85	— 17.4
$NH_2CH_2COOCCH_2 + H_3^+O \rightarrow$ $NH_3^+CH_2COOCCH_2 + H_2O$	10 ml 0.1 N HCl	5 ml 0.4 M glycine ester hydrochloride + 12 ml 0.1 N NaOH	— 5.55	— 5.6
$+AGG^- + H_3^+O \rightarrow$ $AGG^+ + H_2O$	10 ml 0.1 N HCl	10 ml 0.2 M AGG	+ 10.08	+ 10.1
$AGG^- + H_3^+O \rightarrow$ $+AGG^- + H_2O$	10 ml 0.1 N HCl	10 ml 0.2 M AGG + 0.6 ml 2 N NaOH	— 5.10	— 5.1
$HPO_4^{--} + H_3^+O \rightarrow$ $H_2PO_4^- + H_2O$	a) 10 ml 0.1 N HCl b) 5 ml 0.1 N HCl	15 ml 0.0667 M $Na_2HPO_4$ 10 ml 0.0667 M $Na_2HPO_4$	+ 24.10 + 12.02	+ 24.1 + 24.0
$NH_3 + HOOCCH_2 \rightarrow$ $NH_4^+ + -OOCCH_2$ in 1 N KCl	2.5 ml 0.202 N $CH_3COOH$ + 2.5 ml 0.200 N $CH_3COONa$ + 5 ml 2 N KCl	2.5 ml 0.48 N $NH_3$ + 5.0 ml 0.1 N HCl + 7.5 ml 2 N KCl	— 7.22	— 15.4

before mixing were taken as the volume changes accompanying the enzymatic reaction. In this way it was possible to correct for the slight volume change accompanying the mixing of enzyme and substrate and thus to avoid the rather uncertain extrapolation to zero time.

Simultaneously with the dilatometric experiment the chemical reaction was followed in enzyme substrate mixtures of identical composition, covered by kerosene \*) and placed in the same water-bath. In most cases (see p. 117) large two-bulb tubes of a similar construction as the dilatometer vessel were used in order to facilitate sampling immediately after mixing enzyme and substrate. Carboxyl or amino groups were estimated in 2 ml samples taken at intervals (generally after 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 32, 48 and 64 min) using the same standardized pipette throughout an experiment. The essential details of the chemical analysis were as follows:

1. Determination of carboxyl groups (WILLSTÄTTER and WALDSCHMIDT-LEITZ 28)). Titration of solutions containing clupein: Reaction stopped with 2.5 ml alcohol at  $-10^{\circ}$  (at  $20^{\circ}$  a demonstrable enzymatic activity is found in 60% alc.). 7.5 ml alcohol (at  $20^{\circ}$ ) added in the course of the titration (0.0346 N alcoholic NaOH, indicator thymolphthalein). Titration conducted as soon as possible after the sampling.

Titration of solutions containing lactoglobulin: Reaction stopped with 5 ml alcohol at  $20^{\circ}$ . 15 ml alcohol at  $20^{\circ}$  added in the course of the titration. (0.0400 N alcoholic NaOH, indicator thymolphthalein). Titration conducted immediately after the sampling.

The variations in the procedures adopted served the purpose of reducing the slight turbidity of the alcoholic solutions to a minimum.

2. Determination of amino groups (LINDERSTRØM-LANG 29)). Titration of clupein chloride solutions: Reaction stopped with 2 ml acetone at  $-10^{\circ}$ . 3 ml of acetone added in the course of the titration (0.025 N alcoholic HCl, indicator naphthyl red (compare (23)). Titration conducted as soon as possible after sampling.

Titration of lactoglobulin solutions: Reaction stopped with 1 ml 0.054 N alcoholic HCl (an amount which is just a little smaller than the initial titration value) and 5 ml acetone containing naphthyl red. Titration with 0.040 N alcoholic HCl. All solutions were perfectly clear at the endpoint of the titration.

3. Preparation of enzyme and substrate solutions. Since in the present investigation we have only been concerned with the ratio between volume change and chemical change the enzyme concentrations were not so accurately determined. Enzyme solutions were made up simply by dissolving a suitable weight of enzyme filter cake (see (28)) in 0.1 M ammonia buffer (or in some of the clupein experiments in water). The values given in the headings of tables X—XXII are expressed as grams of filter cake per 100 ml reaction mixture. It is self-evident that the same enzyme solution was used for parallel determinations of volume change and chemical decomposition.

Inactive enzyme solutions were prepared by heating the active ones in sealed glass tubes to  $100^{\circ}$  for 15 min. (chymotrypsin) or 60 min. (trypsin).

Clupein sulphate solutions were made up by dissolving the dry preparation in water (concentration given as grams per 100 ml) adjusting to the pH required and adding buffer of the same pH.

A similar procedure was used for preparing clupein chloride solutions only a stock solution of known content was used as starting material. In some cases no buffer was added.

Solutions of genuine lactoglobulin were prepared by dissolving the wet crystals in ammonia and adjusting to pH 8. An amount of HCl equivalent to that of ammonia was added together with enough ammonium chloride to keep the globulin in solution at pH 5. The solution thus obtained could be kept in the refrigerator for weeks without denaturation while solutions adjusted to pH 8 were partly denatured in a few days.

The substrate solutions were prepared from this stock solution by adding the amount of ammonia previously determined and so much water, ammonia and ammonium chloride that the solution became 0.01 N with respect to ammonia and 0.09 N with respect to ammonium chloride (corresponding to pH 8 at  $30^{\circ}$ ) no regard being taken of the first added ammonia. The lactoglobulin concentration was calculated from the content of protein nitrogen by dividing by 15.2 (see (30, 31)). Concentrations are given as grams of lactoglobulin per 100 ml reaction mixture.

Solutions of lactoglobulin denatured at pH 8 were made simply by heating the substrate solution mentioned above in sealed glass tubes for 9 min. at  $80^{\circ} \pm 1^{\circ}$ . No precipitate was formed but the solution became slightly opaque. Upon addition of a buffer-salt solution of pH 5 all protein was precipitated which indicated that denaturation was „complete”.

Denaturation at pH 8 was carried out by bringing the stock solution of lactoglobulin to pH 8 with N/10 HCl and heating it in a sealed glass tube for 32 min. in boiling water. The completeness of the denaturation was tested as above.

\*) However, control experiments showed that kerosene was without influence upon the rate of the enzymatic reaction.

4. Details of sampling etc. The enzyme solutions used were so dilute that a certain danger of spontaneous destruction was present, not so much during the reaction itself (because of the well-known stabilizing effect of the substrate) as during the time necessary to bring the enzyme and substrate solutions to 30°. Care was therefore taken that all enzyme and substrate solutions were kept equally long at 30° before mixing.

This fear of enzyme destruction (which may be exaggerated) led us on the other hand to avoid a still higher dilution of the enzyme which again gave rise to difficulties in time-taking because of the high reaction rate. We were therefore compelled to use a very strict time-schedule in the sampling as will appear from the following scheme.

time in seconds

0—30	mixing of enzyme and substrate (the essential mixing is practically over 5 sec.)
30—55	filling of the 2 ml pipette
55—65	adding the 1 minute sample to the alcohol or alcoholic HCl
90—115	filling of the 2 ml pipette (no rinsing of the pipette between the fillings)
115—125	adding the 2 minute sample to the alcohol etc. etc.

manipulation

In the case of clupein and genuine lactoglobulin the first part of the velocity curve obtained in this way is sufficiently close to being a straight line to allow an extrapolation to zero time; but the rate of decomposition of denatured lactoglobulin is so high and decreases so rapidly with time that special investigations of the conditions in the neighbourhood of zero time were necessary. For this purpose 4 special titration flasks (see BENT ANDERSEN 32)) were used having two separate chambers in the bottom. 1 ml of enzyme was pipetted down into one of the chambers and 1 ml of substrate into the other. The flasks were placed in the water bath at 30° and to one of them 1 ml of 0.054 ml alcoholic HCl was added (see p. 116) before mixing (initial titration value). The contents of the other flasks were mixed and the reaction stopped after 1, 2 and 4 minutes. The initial velocity curve obtained was compared with the curve drawn on the basis of the results from the ordinary experiment (in which 2 ml samples were taken at intervals from a larger amount of reaction mixture). In general the titration values corresponding to 1, 2 and 4 minutes reaction agreed well with those obtained in the normal way, when due regard was taken to differences in pipette volume which caused a slight parallel displacement of the curves relative to one another. The zero point of the normal curve was found by adjusting the curves to each other at the 4 min. point.

#### 5. Result and discussion. Fig. 10\*)

shows the result of a single experiment (the final data are given in table XX). In figures 8 and 9 a comparison is made between the values obtained in experiments with lactoglobulin using both chemical methods described (table IX shows a similar experiment carried out with clupein). It appears from these figures that there is an excellent agreement at the initial stage of the enzymatic break-down. Later on a slight difference is found, the carboxyl determination giving somewhat higher values than the determination of amino groups. We do not believe that the difference is significant. The titration in

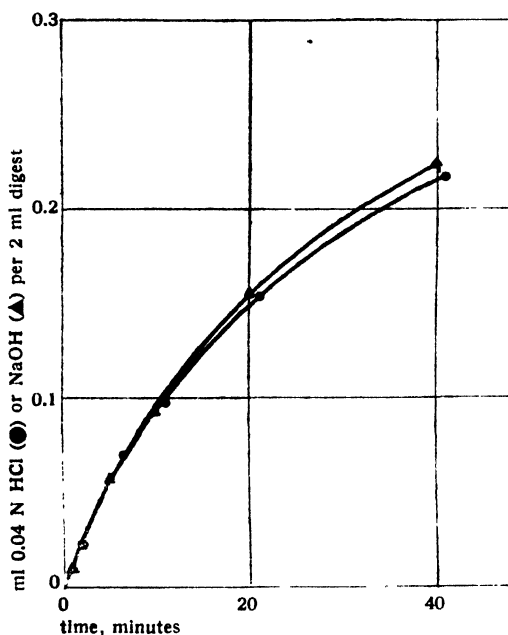


Fig. 8. Comparison of the formation of carboxyl and amino groups during the decomposition of lactoglobulin by chymotrypsin, pH 8. Concentration of lactoglobulin 0.9 per cent. Concentration of chymotrypsin 0.01 per cent.

- ▲ carboxyl curve (WILLSTÄTTER titration).
- amino curve (Acetone titration)

\*) In some cases a very slight increase in the volume of the control dilatometer was observed (about 0.1  $\mu$ l in 60 min.) which may have been due partly to slow temperature changes, partly to reactions between the two phases in the dilatometer. Since these effects are alike in the two dilatometers, the error will cancel in the final results.

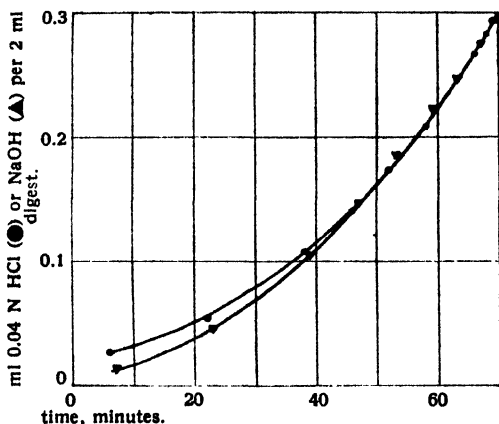


Fig. 9. Comparison of the formation of carboxyl and amino groups during the decomposition of lactoglobulin by trypsin, pH 8. Concentration of lactoglobulin 0.9 per cent. Concentration of trypsin 0.05 per cent.

- ▲ carboxyl curve (WILLSTÄTTER titration)  
● amino curve (Acetone titration)

70 per cent acetone is probably not quite complete when the amino groups liberated belong to shorter peptides. In addition, an escape of ammonia from the digests may also be taken into consideration. In spite of this the acetone method was used in most of the experiments for the reason that the initial titration value is much smaller here than in case of the WILLSTÄTTER titration which means that the errors in pipetting become less significant. Furthermore, in the study of denatured lactoglobulin precipitates appear in the alcoholic solutions while the acid acetone solutions remain perfectly clear.

Tables VIII—XXII and figures 11—17 show the final results and need but little further explanation.  $\Delta V$  and the number of peptide bonds split per protein molecule were calculated on the basis of the molecular weights 5000 for clupein sulphate or chloride and 38000 for lactoglobulin. The agreement

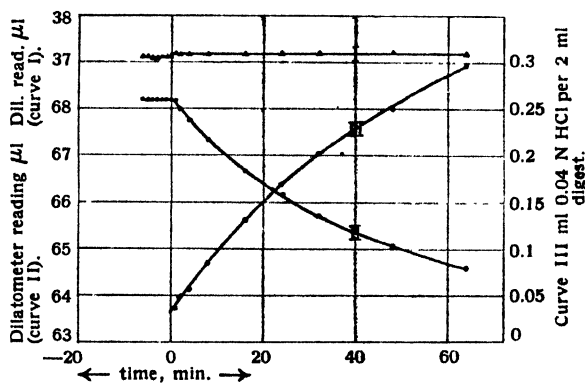


Fig. 10. Details of an experiment.

- Curve I. Control dilatometer  
Curve II. dilatometer containing the reaction mixture.  
Curve III. Titration values (acetone titration).

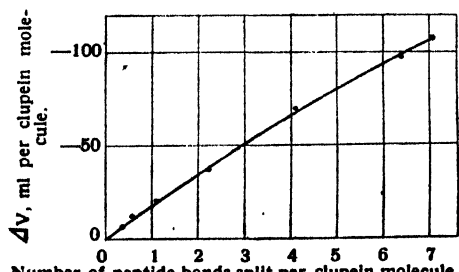


Fig. 11. Splitting of clupein by trypsin pH 8 (see table VIII).

between the results of different experiments in which the protein concentration or the enzyme preparation has been varied is quite good. Considerable variations are only found in the experiments with denatured lactoglobulin, the reason probably being that the temperature at which denaturation took place was not sufficiently well defined. In spite of this the results may serve to illustrate the qualitative effect of denaturation upon the volume change accompanying the enzymatic cleavage.

TABLE VIII.

Splitting of clupein by trypsin.

Concentration of clupein chloride 0.9 per cent. Concentration of trypsin 0.001 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 m. pH 8. In dilatometer 20 ml; for chemical analysis 2 ml. (WILLSTÄTTER titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.0346 N NaOH	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per clupein molecule	Number of pep- tide bonds split per clupein molecule
0	0	0.000	0.000	0	0
1	-0.23	0.038	0.013	- 6.4	0.36
2	-0.43	0.060	0.021	- 12.0	0.58
4	-0.73	0.113	0.039	- 20.3	1.08
8	-1.33	0.230	0.080	- 37.0	2.22
16	-2.51	0.424	0.147	- 69.8	4.08
32	-3.51	0.667	0.230	- 97.6	6.40
64	-3.86	0.730	0.253	-107.3	7.04

TABLE IX.

Splitting of clupein by trypsin.

Concentration of clupein chloride 1.8 per cent. Concentration of trypsin 0.007 per cent. No buffer, pH ca. 6. In dilatometer 20 ml; for chemical analysis 2 ml (WILLSTÄTTER and acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.0346 N NaOH WILLSTÄTTER	$\Delta$ ml 0.025 N HCl Acetone	$\Delta$ millimols per 20 ml Mean	$\Delta V$ ml per clupein molecule	Number of peptide bonds split per clupein molecule
0	0	0.000	0.000	0.000	- 0	0
1	-0.12	0.022	0.053	0.011	- 1.7	0.15
2	-0.25	0.045	0.055	0.015	- 3.5	0.21
4	-0.55	0.083	0.083	0.025	- 7.6	0.35
8	-0.80	0.155	0.168	0.048	-11.1	0.67
16	-1.52	0.285	0.375	0.096	-21.1	1.33
32	-2.80	0.537	0.714	0.183	-38.9	2.54
64	-4.35	0.874	1.147	0.295	-60.5	4.10

TABLE X.

Splitting of clupein by trypsin.

Concentration of clupein chloride 1.8 per cent. Concentration of trypsin 0.0067 per cent. No buffer, pH ca. 6. In dilatometer 20 ml; for chemical analysis 2 ml (WILLSTÄTTER titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.0346 N NaOH	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per clupein molecule	Number of pep- tide bonds split per clupein molecule
0	0	0.000	0.000	0	0
1	-0.10	0.014	0.005	- 1.3	0.07
2	-0.20	0.029	0.010	- 2.6	0.14
4	-0.38	0.050	0.017	- 5.3	0.24
8	-0.70	0.100	0.035	- 9.7	0.49
16	-1.17	0.208	0.072	-16.3	1.00
32	-2.15	0.421	0.146	-29.9	1.97
64	-3.70	0.727	0.252	-51.4	3.50

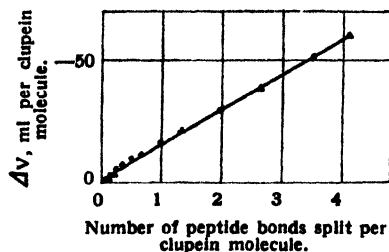


Fig. 12. Splitting of clupein by trypsin pH 6.

▲ (table IX)  
● (table X)

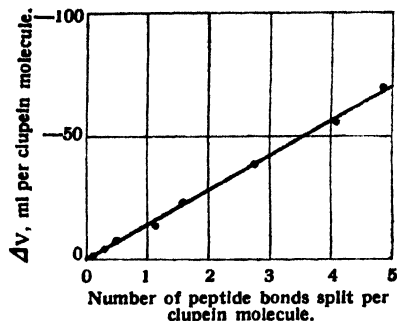


Fig. 13. Splitting of clupein by chymotrypsin pH 8 (table XI).

TABLE XI.

Splitting of clupein by chymotrypsin.

Concentration of clupein sulphate 1.0 per cent. Concentration of chymotrypsin 0.2 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 M. pH 8. In dilatometer 20 ml; for chemical analysis 2 ml (WILLSTÄTTER titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.0346 N NaOH	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per clupein molecule	Number of pep- tide bonds split per clupein molecule
0	0	0.000	0.000	0	0
1	-0.07	0.014	0.005	-1.8	0.18
2	-0.18	0.034	0.012	-4.5	0.30
4	-0.31	0.054	0.019	-7.8	0.48
8	-0.55	0.134	0.046	-13.7	1.15
16	-0.93	0.186	0.064	-23.3	1.60
32	-1.55	0.322	0.111	-38.8	2.78
64	-2.25	0.471	0.163	-56.3	4.08
120	-2.80	0.556	0.193	-70.0	4.83

TABLE XII.

Splitting of genuine lactoglobulin by trypsin.

Concentration of lactoglobulin 1.44 per cent. Concentration of trypsin in 0.05 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 M. pH 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration)

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.12	0.007	0.003	-16	0.4
2	-0.30	0.018	0.007	-40	1.0
4	-0.52	0.034	0.014	-67	1.9
12	-1.36	0.093	0.037	-180	4.9
18	-1.88	0.128	0.051	-249	6.8
24	-2.33	0.160	0.064	-308	8.5
32	-2.70	0.193	0.077	-357	10.2
48	-3.30	0.246	0.098	-436	13.0
64	-3.72	0.273	0.109	-493	14.4

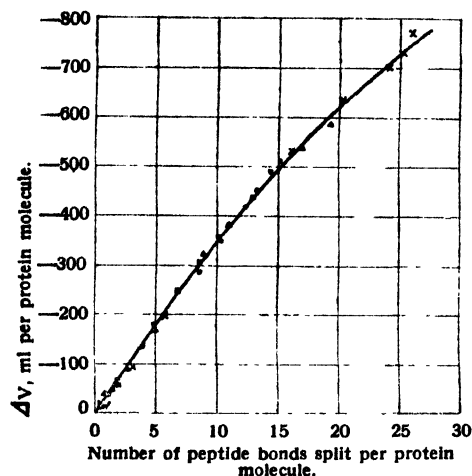


Fig. 14. Splitting of genuine lactoglobulin by trypsin ph 8.

- 0.90 per cent lactoglobulin (table XIII)
- ▲ 0.90 " " " (table XV)
- × 0.72 " " " (table XIV)
- 1.44 " " " (table XII)

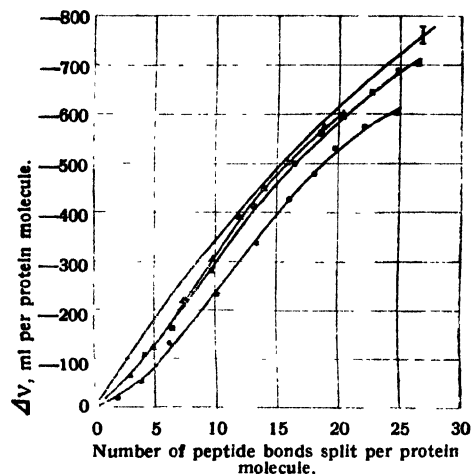


Fig. 15. Splitting of denatured lactoglobulin by trypsin ph 8.

- I curve for genuine lactoglobulin.
- ▲ Denaturation at ph 8 (tables XVI and XVII).
- Denaturation at ph 3 (table XVIII).

TABLE XIII.

Splitting of genuine lactoglobulin by trypsin.

Concentration of lactoglobulin 0.90 per cent. Concentration of trypsin 0.05 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 m. ph 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.06	0.006	0.002	-13	0.4
2	-0.10	0.012	0.005	-21	1.1
4	-0.28	0.019	0.008	-59	1.7
8	-0.64	0.047	0.019	-135	4.0
12	-0.96	0.070	0.028	-202	5.9
18	-1.35	0.102	0.041	-285	8.7
24	-1.66	0.123	0.049	-350	10.3
32	-1.98	0.148	0.059	-418	12.4
48	-2.44	0.181	0.072	-515	15.2

TABLE XIV

Splitting of genuine lactoglobulin by trypsin.

Concentration of lactoglobulin 0.72 per cent. Concentration of trypsin 0.05 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 m. ph 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.05	0.007	0.003	-13	0.8
2	-0.21	0.018	0.007	-56	1.9
4	-0.35	0.030	0.012	-93	3.2



TABLE XIV (Continued).

t min.	$\Delta V$ $\mu l$	$\Delta ml$ 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
8	-0.75	0.055	0.022	-199	5.8
32	-2.01	0.153	0.061	-532	16.2
48	-2.39	0.193	0.077	-633	20.3
64	-2.65	0.228	0.091	-702	24.1
80	-2.76	0.232	0.093	-731	24.6
96	-2.91	0.246	0.098	-771	26.0

TABLE XV.

Splitting of genuine lactoglobulin by trypsin.

Concentration of lactoglobulin 0.90 per cent. Concentration of trypsin in 0.05 per cent. Concentration of  $NH_4^+$ ,  $NH_3$  buffer 0.1 m. ph 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu l$	$\Delta ml$ 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.18	0.009	0.004	-38	0.8
2	-0.22	0.018	0.007	-46	1.5
4	-0.42	0.033	0.013	-89	2.7
8	-0.80	0.059	0.024	-169	5.1
12	-1.14	0.078	0.031	-241	6.5
18	-1.54	0.105	0.042	-325	8.9
24	-1.82	0.131	0.052	-384	11.0
32	-2.14	0.157	0.063	-452	13.3
48	-2.56	0.202	0.081	-540	17.1
64	-2.78	0.230	0.092	-587	19.5

TABLE XVI.

Splitting of denatured lactoglobulin by trypsin.

(Denaturation at ph 8). Concentration of lactoglobulin 0.96 per cent. Concentration of trypsin 0.05 per cent. Concentration of  $NH_4^+$ ,  $NH_3$  buffer 0.1 m. ph 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu l$	$\Delta ml$ 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.10	0.024	0.010	-20	2.0
2	-0.26	0.049	0.020	-52	4.0
4	-0.67	0.079	0.032	-133	6.4
8	-1.18	0.130	0.052	-234	10.3
12	-1.71	0.169	0.063	-339	13.5
18	-2.16	0.203	0.081	-429	16.1
24	-2.42	0.229	0.092	-480	18.3
32	-2.69	0.251	0.100	-534	19.8
48	-2.89	0.281	0.112	-574	22.2
64	-3.06	0.313	0.125	-607	24.8

TABLE XVII.

## Splitting of denatured lactoglobulin by trypsin.

(Denaturation at pH 8). Concentration of lactoglobulin 0.96 per cent. Concentration of trypsin 0.05 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 M. pH 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis. (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta v$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
2	-0.32	0.037	0.015	-64	3.0
4	-0.62	0.062	0.025	-123	5.0
8	-1.10	0.098	0.039	-218	7.7
12	-1.53	0.125	0.050	-304	9.9
18	-1.97	0.152	0.061	-391	12.1
24	-2.26	0.177	0.071	-449	14.1
32	-2.54	0.199	0.080	-504	15.9
48	-2.88	0.237	0.095	-572	18.9
64	-3.06	0.257	0.103	-607	20.4

TABLE XVIII.

## Splitting of denatured lactoglobulin by trypsin.

(Denaturation at pH 9). Concentration of lactoglobulin 0.905 per cent. Concentration of trypsin 0.05 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 M. pH 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta v$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.52	0.050	0.020	-109	4.2
2	-0.78	0.078	0.031	-164	6.5
4	-1.34	0.115	0.046	-281	9.7
8	-1.97	0.158	0.063	-414	13.2
12	-2.39	0.194	0.078	-502	16.4
18	-2.68	0.223	0.089	-563	18.7
24	-2.85	0.243	0.097	-598	20.4
32	-3.07	0.270	0.108	-644	22.7
48	-3.28	0.296	0.118	-688	24.8
64	-3.36	0.311	0.126	-705	26.4

TABLE XIX.

## Splitting of genuine lactoglobulin by chymotrypsin (prep. I).

Concentration of lactoglobulin 0.905 per cent. Concentration of chymotrypsin 0.010 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 M. pH 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta v$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.11	0.006	0.002	-23	0.4
2	-0.15	0.012	0.005	-31	1.1
4	-0.41	0.024	0.010	-86	2.1
8	-0.77	0.044	0.018	-161	3.8
16	-1.40	0.078	0.031	-294	6.5

TABLE XIX (continued).

t. min.	$\Delta V$ $\mu l$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
24	-1.83	0.113	0.045	-384	10.3
32	-2.25	0.144	0.058	-472	12.2
48	-2.83	0.193	0.077	-594	16.2
64	-3.25	0.231	0.092	-682	19.3
80	-3.57	0.255	0.102	-749	21.4

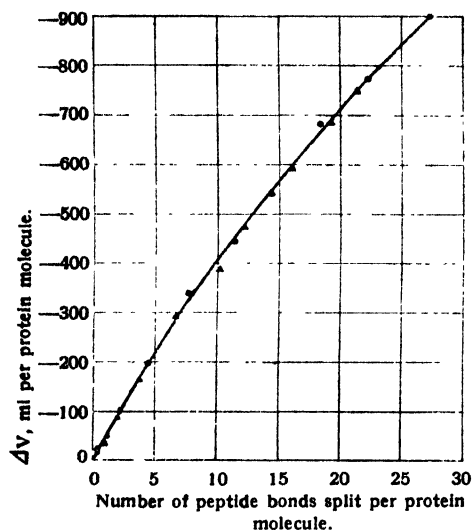


Fig. 16. Splitting of genuine lactoglobulin by chymotrypsin pH 8.

- ▲ Preparation I (table XIX).  
● " II (table XX).

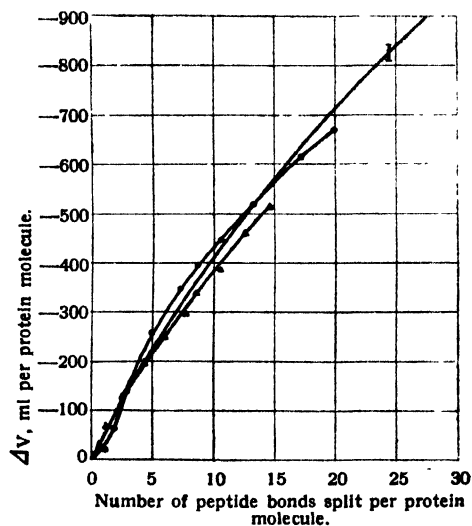


Fig. 17. Splitting of denatured lactoglobulin by chymotrypsin pH 8.

- I curve for genuine lactoglobulin.  
▲ Denaturation at pH 8 (table XXI)  
● " " pH 8 (table XXII)

TABLE XX.

Splitting of genuine lactoglobulin by chymotrypsin (prep. II).

Concentration of lactoglobulin 0.905 per cent. Concentration of chymotrypsin 0.012 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 M. pH 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis. (Acetone titration).

t. min.	$\Delta V$ $\mu l$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.06	0.006	0.002	-13	0.4
2	-0.23	0.015	0.006	-48	1.2
4	-0.48	0.026	0.010	-101	2.1
8	-0.94	0.053	0.021	-197	4.4
16	-1.62	0.091	0.036	-340	7.6
24	-2.12	0.136	0.054	-445	11.3
32	-2.57	0.169	0.068	-540	14.3
48	-3.26	0.218	0.087	-685	18.3
64	-3.68	0.265	0.106	-773	22.3
96	-4.28	0.326	0.130	-899	27.3

TABLE XXI.

Splitting of denatured lactoglobulin by chymotrypsin (prep. I). (Denaturation at pH 8). Concentration of lactoglobulin 0.090 per cent. Concentration of chymotrypsin 0.01 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 M. pH = 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.14	0.008	0.003	- 30	0.7
2	-0.32	0.014	0.006	- 68	1.2
4	-0.60	0.031	0.012	-127	2.6
8	-0.92	0.053	0.021	-194	4.5
12	-1.18	0.074	0.030	-249	6.2
18	-1.40	0.094	0.038	-295	7.9
24	-1.60	0.103	0.041	-338	8.7
32	-1.82	0.127	0.051	-384	10.7
48	-2.18	0.150	0.060	-460	12.7
64	-2.42	0.174	0.070	-511	14.7

TABLE XXII.

Splitting of denatured lactoglobulin by chymotrypsin (prep. I). (Denaturation at pH 3). Concentration of lactoglobulin 0.905 per cent. Concentration of chymotrypsin 0.01 per cent. Concentration of  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$  buffer 0.1 M. pH = 8. 20 ml in dilatometer; 2 ml for chemical analysis (Acetone titration).

t min.	$\Delta V$ $\mu\text{l}$	$\Delta$ ml 0.04 N HCl	$\Delta$ millimols per 20 ml	$\Delta V$ ml per protein molecule	Number of pep- tide bonds split per protein molecule
0	0	0	0	0	0
1	-0.10	0.013	0.005	- 21	1.1
2	-0.30	0.022	0.009	- 63	1.9
4	-0.66	0.034	0.014	-139	2.9
8	-1.24	0.061	0.024	-260	5.0
12	-1.65	0.087	0.035	-347	7.4
18	-1.88	0.105	0.042	-395	8.8
24	-2.14	0.127	0.051	-449	10.7
32	-2.47	0.161	0.064	-519	13.4
48	-2.94	0.208	0.083	-617	17.4
64	-3.18	0.237	0.095	-668	20.0

#### IV. Summary.

Certain theoretical problems connected with the enzymatic break-down of proteins have been discussed. It was found that the splitting of a peptide bond in a simple peptide chain cannot be accompanied by a contraction higher than 25 ml/mol. The volume change accompanying the break-down of lactoglobulin and clupein by trypsin and chymotrypsin has been determined. Contractions as high as 50 ml/mol were found for lactoglobulin, while the values for clupein were normal, viz., 15 ml/mol. Hence the break-down of lactoglobulin cannot be explained exclusively as an opening up of peptide linkages in a simple peptide chain, while the splitting of clupein is in good agreement with this assumption.

- 1) P. Rona, H. Fischgold, *Bioch. Zs.* **261**, 66 (1933). — 2) P. Rona, H. Fischgold, *Bioch. Zs.* **261**, 366 (1933). — 3) M. Sreenivasaya, B. N. Sastri, H. B. Sreerangachar, *Biochem. Jl.* **28**, 351 (1934). — 4) M. Sreenivasaya, H. B. Sreerangachar, *Biochem. Jl.* **28**, 1219 (1934). — 5) M. Sreenivasaya, K. Bhagvat, *Ergebn. Enzymforsch.* **6**, 234 (1937). — 6) K. Linderstrøm-Lang, H. Lanz, C. R. Lab. Carlsberg, *Sér. chim.* **21**, 315 (1938). — 7) H. H. Weber, D. Nachmannsohn, *Bioch. Zs.* **204**, 215 (1929). — 8) H. H. Weber, *Bioch. Zs.* **218**, 1 (1930). — 9) E. J. Cohn, T. L. McMeekin, J. T. Edsall, M. H. Blanchard, *Jl. Amer. Chem. Soc.* **56**, 784 (1934). — 10) T. L. McMeekin, E. J. Cohn, J. H. Weare, *Jl. Amer. Chem. Soc.* **57**, 626 (1935). — 11) J. P. Greenstein, J. Wyman, *Jl. Amer. Chem. Soc.* **58**, 463 (1936). — 12) J. T. Edsall, *Chemistry of amino acids and proteins*, ed. by C. L. A. Schmidt, Springfield and Baltimore (1938). — 13. J. Traube, *Sammlung chem. u. chem.-techn. Vorträge* **4**, 255 (1899). — 14) E. J. Cohn, *Ergebnisse der Physiologie* **33**, 781 (1931). — 15) F. E. Lindquist, C. L. A. Schmidt, C. R. Lab. Carlsberg, *Sér. chim.* **22**, 307 (1938), Sørensen Jubilee volume. — 16) E. Waldschmidt-Leitz, E. Kofranyi, *Zs. physiol. Chem.* **236**, 181 (1935). — 17) K. Linderstrøm-Lang, *Trans. Faraday Soc.* **31**, 1 (1935). — 18) K. Linderstrøm-Lang, R. D. Hotchkiss, G. Johansen, *Nature* **142**, 996 (1938). — 19) K. Linderstrøm-Lang, C. F. Jacobsen, C. R. Lab. Carlsberg, *Sér. chim.* **23**, 289 (1940). — 20) W. J. Loughlin, W. C. Mc Cullagh Lewis, *Biochem. Jl.* **26**, 476 (1932). — 21) F. Haurowitz, *Kolloid-Zs.* **71**, 198 (1935). — 22) A. Kossel, *Protamine und Histone*, Leipzig and Wien, 1929. — 23) K. E. Rasmussen, K. Linderstrøm-Lang, C. R. Lab. Carlsberg **20**, No. 10 (1935); *Zs. physiol. Chem.* **227**, 181 (1934). — 24) A. H. Palmer, *Jl. of Biol. Chem.* **104**, 359 (1934). — 25) M. Sørensen, S. P. L. Sørensen, C. R. Lab. Carlsberg, *Sér. chim.* **23**, 55 (1939). — 26) J. H. Northrop, *Crystalline enzymes*, New York, 1939. — 27) K. Linderstrøm-Lang, *Die Methoden der Fermentforschung* (Myrbäck and Bamann), Leipzig, 1940. — 28) R. Willstätter, E. Waldschmidt-Leitz, *Ber. Chem. Ges.* **54**, 2988 (1921). — 29) K. Linderstrøm-Lang, C. R. Lab. Carlsberg **17**, No. 4 (1927); *Zs. physiol. Chem.* **173**, 32 (1928). — 30) K. O. Pedersen, *Biochem. Jl.* **30**, 961, (1936). — 31) K. Linderstrøm-Lang, C. F. Jacobsen, C. R. Lab. Carlsberg, *Sér. chim.* **23**, 179 (1940); *Enzymol.* **8**, 64 (1940). — 32) B. Andersen, C. R. Lab. Carlsberg, *Sér. chim.* **22**, 36 (1938), Sørensen Jubilee volume.
-

# Sur la nature des plastéines

PAR

I. G. MENSOROW

(Lab. pour Enzymol. de la sect. de Chimie physiol. de l'Inst. Gorky  
pour Méd. expér. VIEM, Moscou)

(8.III.41)

Il existe à présent deux opinions opposées sur la nature des plastéines. Selon l'une les plastéines sont des produits de l'action synthétisante des enzymes protéolytiques. C'est le point de vue de WASTENEYS et BOROOK <sup>1)</sup>, RONA et OELKERS <sup>2)</sup>, CUTHBERTSON et TOMPSETT <sup>3)</sup>, BLAGOWESTSCHENSKY et JEREMEJEV <sup>4)</sup>. Selon l'autre les plastéines proviennent de la destruction ultérieure des peptones. FOLLEY <sup>5)</sup> admet que les plastéines sont formées non par synthèse mais par hydrolyse des peptones avec formation successive d'anhydrides cycliques. Pour prouver son point de vue FOLLEY a recours au poids moléculaire des plastéines qui est assez bas (les déterminations du poids moléculaire des plastéines ont été effectuées dans le laboratoire de SVEDBERG). Un mémoire de MENSOROW <sup>6)</sup> est également dédié à l'étude des plastéines. L'auteur a analysé une plastéine et la protéine dont celle-ci était provenue et a trouvé que la composition des aminoacides était très semblable et même presque identique dans les deux substances.

N. I. GAWRILOW, PARADASCHWILI et GOWOROW <sup>7)</sup> ont étudié la nature des plastéines à l'aide de la spectrophotométrie de la réaction biuret; ils ont constaté que la formation des plastéines est accompagnée d'une diminution d'azote aminé et en même temps d'une diminution d'intensité de la réaction biuret.

La divergence d'opinions sur la nature des plastéines prouve que cette question n'est pas encore claire et que le matériel expérimental à ce sujet ne permet pas de faire des conclusions définitives.

Le but de notre travail était d'étudier le comportement des plastéines envers les différents enzymes protéolytiques, ce qui pourrait contribuer à notre avis à l'élucidation du mécanisme de formation des plastéines.

## Partie Expérimentale.

**Préparation de plastéine.** Pour préparer de la plastéine nous nous sommes basés sur l'observation d'ABDERHALDEN et BUADZE <sup>8)</sup> que la pepsine agit plus énergiquement sur les albumines que sur les globulines; nous avons donc employé de l'albumine d'oeuf. L'enzyme était de la pepsine purifiée selon WILLSTÄTTER <sup>9)</sup>; son activité était déterminée par la méthode de FULD et LEVINSON <sup>10)</sup>.

Pour la digestion nous nous sommes servis d'une solution de protéine à 2,5 % (30 g) avec 1,8 g de pepsine. Durée 6 jours à 37—38° C; pH : 1.55—1.89.

Les données sur l'hydrolyse de l'albumine d'oeuf sont représentées sur le tableau I.

Le pH était déterminé potentiométriquement à l'aide d'une électrode à chinhydrone. Pour les dosages de l'azote aminé selon SÖRENSEN-GAWRILOW <sup>11)</sup> on prenait 10 cm<sup>3</sup> de la solution.

TABLEAU I.

Temps	pH	Azote aminé en cm <sup>3</sup> de NaOH 0,2 n
0	1,55	0,75
3 jours . . . .	1,78	—
6 „ . . . .	1,89	2,00

Après la digestion la solution était chauffée pendant 30 min. au bain-marie, filtrée et concentrée dans le vide à 28—33° C jusqu'à 1/20 de son volume initial. Le pH du hydrolysate enzymatique était

ajustée à l'aide d'hydroxyde de sodium à 4,8—5,0. Les produits de l'hydrolyse peptique obtenus de cette manière n'étaient pas précipités par l'acide trichloracétique à 10 %.

Cet hydrolysats parfaitement clair était additionné de pepsine (0,5 gr), bien agité et placé dans un thermostat à 37° avec un peu de toluène.

En même temps on posait un essai témoin avec la même solution concentrée de produits de digestion peptique mais additionnée de pepsine inactivée par chauffage. Après 5 jours il se formait dans la fiole à essai un sédiment qu'on séparait par filtration et traitait avec de l'alcool à 90 %. La solution alcoolique était séparée par décantation et centrifugation et le sédiment traité successivement par l'alcool à 50, 75, 90 et 96 % en ayant soigné chaque fois de bien imbiber le résidu d'alcool plus concentré. Puis on traitait le résidu avec de l'éther sec et le laissait sécher dans un dessiccateur-à-vide sur de l'acide sulfurique.

Nous avons obtenu par ce procédé 6,5 g de plastéine pour nos études.

La solution dans l'essai témoin traité de la même façon s'était un peu troublée, mais il ne s'était pas formé de résidu.

Nous avons déjà noté que l'action des enzymes protéolytiques du type des protéinases (pepsine et chymosine) sur les produits de digestion peptique des protéines est accompagnée d'une diminution des groupes carboxyle et aminés libres, ce qui a servi d'argument en faveur de la nature synthétique des plastéines. Nos expériences sont en parfait accord avec les résultats des auteurs cités plus haut.

Nous nous sommes servis dans nos essais du procédé suivant: pour déterminer la quantité des groupes carboxyles libres d'après WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ (par titrage avec de l'hydroxyde de sodium  $\frac{1}{10}$  n alcoolique) ainsi que les groupes aminés libres selon SÖRENSEN on préparait un mélange de peptones à 38 % avec la solution de pepsine à 10 % en certaines proportions et on effectuait les dosages dans des intervalles de temps définis.

Les résultats de ces dosages sont rassemblés dans les tableaux II, III et IV.

Le tableau II représente la diminution des groupes carboxyles, le tableau III celle des groupes aminés dans le mélange enzyme-substrat.

TABLEAU II.

Conditions d'essai. 2 cm<sup>3</sup> d'hydrolysats peptique d'albumine d'oeuf, 0,2 cm<sup>3</sup> de solution de pepsine, 37° C, ph 4,8. Dosage selon WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ.

Durée, heures . . . . .	0	$\frac{1}{2}$	2	5	96
cm <sup>3</sup> de NaOH $\frac{1}{10}$ n . . . . .	15,4	15,2	14,8	14,3	14,1
Diminution de l'acidité . . . . .	—	0,2	0,6	1,1	1,3

TABLEAU III.

Condition d'essai. 2 cm<sup>3</sup> d'hydrolysats peptique d'albumine d'oeuf, 0,2 cm<sup>3</sup> de solution de pepsine, 37° C, ph 4,8. Dosage selon SÖRENSEN-GAVRILOV.

Durée, heures . . . . .	0	$\frac{1}{2}$	2	5	96
cm <sup>3</sup> de NaOH $\frac{1}{10}$ n . . . . .	14,1	13,9	13,7	13,4	13,3
Diminution d'azote aminé en cm <sup>3</sup> NaOH 0,1 n	—	0,2	0,4	0,7	0,8

TABLEAU IV.

Changement de quantité des groupes carboxyle et aminés pendant la formation des plastéines.

Durée, heures	Diminution des groupes carboxyle et aminés en cm <sup>3</sup> 0,1 n NaOH		$\frac{—NH_2}{—COOH}$
	$—NH_2$	$—COOH$	
$\frac{1}{2}$	0,2	0,2	1,0
2	0,4	0,6	0,66
5	0,7	1,1	0,64
96	0,8	1,3	0,62

Ces résultats montrent que la formation des plastéines à partir des produits d'hydrolyse peptique de l'albumine d'oeuf est accompagnée d'une diminution des groupes carboxyle et aminés libres.

**Préparation de l'érepsine.** Celle-ci a été préparée selon WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>12)</sup> de la muqueuse des intestins grêles du porc. 100 g de muqueuse ont été triturés dans un mortier avec 500 cm<sup>3</sup> de glycérol à 87 %. Après un jour de digestion à température ordinaire on diluait 50 cm<sup>3</sup> de cette suspension avec 150 cm<sup>3</sup> d'eau distillée et centrifugait le mélange. Pour purifier l'extrait on ajoutait 10 cm<sup>3</sup> du liquide clair d'un cm<sup>3</sup> d'acide acétique 0,1 n et séparait le sédiment formé en majeure partie de protéines par filtration et centrifugation. Le préparat enzymatique obtenu nous servait pour nos essais.

**Détermination de l'activité de l'érepsine.** L'activité été dosée d'après WALDSCHMIDT-LEITZ par digestion d'un peptide, la glycyl-glycine. L'hydrolyse était suivie par l'augmentation de l'acidité en solution alcoolique.

Conditions d'essai: 20 cm<sup>3</sup> d'une solution 0,1 m de glycyl-glycine (ph-7,8), 8 cm<sup>3</sup> de solution enzymatique, 2 cm<sup>3</sup> d'eau et 5 cm<sup>3</sup> de toluène; température 37°, ph 7,8.

On prenait de temps en temps des épreuves de 10 cm<sup>3</sup> et titrait d'après WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ avec NaOH 1/6 n dans de l'alcool à 90 % et 0,5 cm<sup>3</sup> de thymol phthaléine à 0,5 %.

Le tableau V donne l'augmentation d'acidité en cm<sup>3</sup> de NaOH 0,1 n, correspondant à l'action de l'érepsine.

TABLEAU V.

Temps d'action en min.	Quantité de cm <sup>3</sup> d'hydroxyde de sodium 0,1 n alcoolique
0	8,0
180	10,8

### Action de l'érepsine sur la plastéine.

Condition d'essai: 70 cm<sup>3</sup> de solution de plastéine à 2 % (ph 7,8), 10 cm<sup>3</sup> de solution enzymatique, 25 cm<sup>3</sup> de tampon phosphate (ph 7,8) et 10 cm<sup>3</sup> de toluène. Température d'essai 33°, ph 7,8.

On prend à des intervalles fixés 10 cm<sup>3</sup> de la solution d'essai pour la titrer selon WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ. Dans un essai témoin effectué dans les mêmes conditions mais avec de l'érepsine inactivée par le chaud il n'y avait pas de changement d'acidité.

Les résultats sont donnés dans le tableau VI:

TABLEAU VI.

Temps, heures . . . . .	0	30	48	72
cm <sup>3</sup> 1/6 n NaOH . . . . .	1,60 1,55	1,6 1,6	1,7 1,65	1,7 1,7
Accroissement de l'acidité . . . . .	—	0	0,1	0,1

Ces chiffres montrent nettement que les plastéines ne sont pas hydrolysées par l'érepsine.

L'érepsine est selon WALDSCHMIDT-LEITZ, BALLS et WALDSCHMIDT-GRASER<sup>13)</sup> un mélange d'aminopolypeptidase et de dipeptidase. Son substrat spécifique c'est les peptides simples (WALDSCHMIDT-LEITZ<sup>14)</sup>). L'hydrolyse de peptone et des protamines par l'érepsine s'explique selon WALDSCHMIDT-LEITZ par la présence de trypsine dans les préparats d'érepsine employés pour les expériences.

Nos résultats ne permettent pas de faire la conclusion que l'action de la pepsine sur les produits d'hydrolyse peptique d'albumine d'oeuf est accompagnée d'une nouvelle hydrolyse avec formation de peptides de constitution plus ou moins simple. Si une telle hydrolyse aurait eu lieu l'aminopolypeptidase de l'érepsine aurait pu exercer son action hydrolysante en présence des aminogroupes libres des peptides.



Il était aussi intéressant d'étudier l'action de la pepsine sur la plastéine. WASTENEYS et BOROOK <sup>1)</sup>, ainsi que BLAGOWESTSCHENSKY et JEREMEJEV <sup>4)</sup> ont réussi à constater dans leurs études publiées en 1934 une scission des plastéines par la pepsine. Il est regrettable, que ces auteurs ont effectué leurs essais avec des enzymes non purifiés. Il faut noter ici que cette circonstance n'a pas été prise en considération par ces auteurs de même que par tous ceux qui se sont occupés des plastéines.

Il est connu que les préparats de commerce de pepsine contiennent de la cathepsine de la muqueuse de l'estomac. La polypeptidase qui fait part de la cathepsine peut manifester son action quand la réaction du milieu est optimale pour elle.

Néanmoins, nous n'avons aucun droit d'objecter contre les essais sur l'action de pepsine sur les plastéines effectués à l'aide d'enzymes impurs, car à ce que nous savons, il n'y pas de propos pour supposer que les préparats de pepsine contiennent d'autres protéinases qui puissent hydrolyser les protéines à réaction fortement acide.

Nous avons effectué nos essais avec de la pepsine purifiée.

### Action de la pepsine sur la plastéine.

Le préparat de pepsine dont nous disposons a été purifié selon WILLSTÄTTER <sup>9)</sup>. L'activité était vérifiée selon la méthode de FULD et LEVINSON <sup>10)</sup>.

Conditions de réaction: 70 cm<sup>3</sup> d'une solution de 2 % de plastéine (ph 2,0), 0,3 g de pepsine, 10 cm<sup>3</sup> de toluène; température d'essai 33°, ph 2,0.

L'essai témoin avec de la pepsine inactivée par le chaud était conduit dans les mêmes conditions; il n'y avait pas d'augmentation d'acidité.

Nous avons contrôlé la digestion enzymatique par dosage des groupes carboxyle selon WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ. On prenait 5 cm<sup>3</sup> de la solution enzyme-substrat pour chaque dosage. Les résultats sont montrés dans le tableau VII.

TABLEAU VII.

Temps, heures . . . . .	0	29	42	96
cm <sup>3</sup> de NaOH $\frac{1}{6}$ n . . . . .	3,4 3,4	3,6 3,55	4,05 4,05	4,25 4,25
Accroissement de l'acidité . . . . .	—	0,2	0,65	0,85

On voit de ce tableau que l'action de la pepsine sur la plastéine dans nos essais confirme les résultats des auteurs indiqués plus haut.

### Action de carboxypolypeptidase sur la plastéine.

Préparation de carboxypolypeptidase. L'enzyme a été préparé à partir de pancréatine selon WALDSCHMIDT-LEITZ <sup>15)</sup>.

Détermination d'activité de la carboxypolypeptidase.

Conditions d'essai: 30 cm<sup>3</sup> de solution de peptone à 2 %, 10 cm<sup>3</sup> de solution enzymatique, 15 cm<sup>3</sup> de tampon phosphate (ph 7,7), 10 cm<sup>3</sup> de toluène, température d'essai 33° C, ph 7,6—7,7.

On suivait le cours de l'hydrolyse en prenant de temps en temps des épreuves de 10 cm<sup>3</sup> et en dosant leur teneur en carboxyles libres selon WILLSTÄTTER et WALDSCHMIDT-LEITZ. En même temps on posait un essai témoin avec de la carboxypolypeptidase inactivée. La quantité de cm<sup>3</sup> d'alcali employée par l'essai témoin était soustraite de celle employée par l'essai avec l'enzyme actif. Après 5 h. d'action enzymatique l'augmentation d'acidité a atteint 1,65 cm<sup>3</sup>, ce qui prouve que l'enzyme était assez actif.

Action de la carboxypolypeptidase sur la plastéine.

Conditions d'essai: 20 cm<sup>3</sup> de solution de plastéine à 2 % (ph 7,7), 25 cm<sup>3</sup> de tampon-phosphate (ph 7,7); 10 cm<sup>3</sup> de solution enzymatique et 10 cm<sup>3</sup> de toluène; température d'essai 33° C, ph 7,6—7,7.

On prenait pour les dosages des groupes carboxyles libres 5 cm<sup>3</sup> de la solution enzyme-substrat.

Les résultats sont donnés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII.

Temps. heures . . . . .	0	5	24	30
cm <sup>3</sup> NaOH 1/8 n . . . . .	0,8 0,8	0,75 0,8	0,8 0,8	0,8 —

Ces résultats montrent clairement que la plastéine n'est pas hydrolysée par la carboxypolypeptidase.

Après avoir constaté que la plastéine n'est pas hydrolysée par les enzymes protéolytiques du type des peptidases (peptidases de l'érepsine et carboxypolypeptidase), mais se laisse dédoubler par les catalyseurs biologiques du type protéinase (pepsine), il nous était d'importance de savoir quelle serait l'action de la trypsine sur la plastéine. En ce but nous avons fait agir le total des enzymes de la trypsine sur la plastéine.

#### Action de trypsine sur la plastéine.

Conditions d'essai. 20 cm<sup>3</sup> d'une solution de plastéine à 2 % (ph 9,0), 25 cm<sup>3</sup> de tampon phosphate (ph 8,8), 0,15 g d'trypsine, 10 cm<sup>3</sup> d'toluène. Température d'essai 33° C, ph 8,7 — 9,0.

La vitesse de l'hydrolyse était contrôlée par dosage des groupes carboxyle libres; on prenait 5 cm<sup>3</sup> de la solution pour chaque dosage.

Les résultats sont donnés dans le tableau IX:

TABLEAU IX.

Temps. heures . . . . .	0	5	24.5	72
cm <sup>3</sup> NaOH 1/8 n . . . . .	0,80 0,80	1,3 1,25	1,45 1,45	1,8 1,75
Accroissement de l'acidité . . . . .	—	0,5	0,65	1,0

Ces essais montrent que la plastéine est hydrolysée par la trypsine.

#### Conclusions.

En résumant les résultats de tout ce que nous venons d'exposer on peut conclure que les plastéines sont des produits synthétiques qui se forment à partir des produits primaires de scission des protéines.

Quelles sont les preuves en faveur de cette conception? La preuve essentielle à notre avis c'est que la plastéine préparée du blanc d'oeuf est hydrolysée par les protéinases (pepsine), tandis que les produits peptiques à partir desquelles on la prépare ne sont pas attaqués par ces enzymes. Le manque d'action du côté des peptidases de l'érepsine et surtout de la carboxypolypeptidase tryptique sont aussi des faits parlant en faveur d'une synthèse de plastéines à partir des produits de dédoublement peptique. Il nous semble que la justesse de notre conclusion est supportée par la ressemblance et même par l'identité de la composition aminoacide de la plastéine et de la protéine initiale.

Enfin, la nature synthétique des plastéines est rendue probable par l'étude du processus de formation de la plastéine et surtout par la diminution de la teneur en groupes carboxyle et aminés libres après l'action de pepsine sur une solution concentrée de produits de digestion peptique de protéine.

L'étude de la composition aminoacide de la plastéine, nos observations sur l'action de différents enzymes sur la plastéine et les données sur le processus de sa formation parlent pour une nature synthétique des plastéines.

Il m'est un devoir agréable d'exprimer ici ma profonde reconnaissance au Prof. A. W. BLAGOWESTSCHENSKY pour la direction de ces études.

1) H. Wasteneys, H. Borsook, *Jl. of Biol. Chem.* **72**, 15, 563, 575, 633, 675 (1925); *Physiol. Reviews* **10**, 110 (1930). — 2) P. Rona, H. Oelkers, *Bioch. Zs.* **203**, 298 (1928). — 3) D. Cuthbertson, S. Tompsett, *Biochem. Jl.* **25**, 2004, (1931). — 4) A. Blagowestschenski, G. Jeremejew, *Bioch. Zs.* **270**, 66 (1934). — 5) S. Folley, *Biochem. Jl.* **26**, 99 (1932). — 6) I. Mensorow, *Bull. biol. et méd. expér. (russe)* **VI**, 8, 301 (1938). — 7) N. Gawrilow, A. Paradaschwili, A. Goworow, *Enzymol.* **6**, 94 (1939). — 8) E. Abderhalden, S. Buadze, *Fermentforsch.* **13**, 43, 505 (1933). — 9) P. Rona, *Praktikum der physiol. Chemie*, III, 250 (1928). — 10) E. Fuld, L. A. Levison, *Bioch. Zs.* **6**, 473 (1907). — 11) N. I. Gavrilov, *Etudes pratiques en chimie biologique, Manuel pour chimie biologique* (1927). — 12) E. Waldschmidt-Leitz, *Zs. physiol. Chem.* **151**, 31 (1926). — 13) E. Waldschmidt-Leitz, A. Balls, *Joh. Waldschmidt-Graser, Ber. Chem. Ges.* **62**, 956 (1926). — 14) E. Waldschmidt-Leitz, *Z. physiol. Chem.* **149**, 203 (1925). — 15) E. Waldschmidt-Leitz, *Zs. angew. Chem.* **44**, 573 (1931).

# Some observations on the oxygen consumption of tissue pulp

BY

G. A. OVERBEEK AND C. C. POLDER

(*Dep. of Pharmacol. of the Univ. of Leiden, Holland*)

With 8 figures.

(10.III.41.)

In the course of investigations on the influence of adrenaline on the oxygen consumption of muscle pulp a peculiar conduct of the respiration was observed.

It is a well-known fact that *in vitro* tissue respiration tends to decline progressively and SZENT GYÖRGYI<sup>1)</sup> showed that this phenomenon is caused by the diffusion of fumaric acid from the tissue into the suspension medium. Sometimes, however, (e.g. the methyleneblue respiration of mammalian erythrocytes) the oxygen consumption may remain constant for several hours (OVERBEEK<sup>2)</sup> \*). We now made the surprising observation that the oxygen consumption of muscle pulp may follow still other lines. After diminishing during the first hour in the ordinary way, the oxygen consumption gradually increased, until after 2-4 hours quantities of oxygen were consumed surpassing by far the amounts taken up during the same time in the first part of the experiment (fig. 1).

The importance of this conduct for the evaluation of various kinds of experiments can best be demonstrated by our investigations on the influence of adrenaline on tissue respiration.

The aim of these experiments was to clear the existing controversy in view of the question whether adrenaline either augments or decreases the peripheral oxygen consumption (SOSKIN *et al.*<sup>4)</sup>, CORI and CORI<sup>5)</sup>).

Adult rats starved for about 16 hours were subcutaneously injected with 0.2 mg of adrenaline. 1½ hours later the animals were decapitated, muscles from both hind legs were rapidly cut off with scissors and ground through a LATAPIE mill. The pulp was mixed with the salt solution of KREBS and HENSELEIT<sup>6)</sup>; 2 cm of the suspension were pipetted into a respiration vessel and the oxygen consumption measured according to WARBURG in the usual way.

The suspension was then transferred to a centrifuge tube and heated to boiling point in a water-bath for some minutes in order to coagulate the proteinic matter. After centrifuging, the residue was dried until constancy of weight was obtained.

The suspensions were found to contain 30—50 mg/cm of dry matter. These values being remarkably constant (at least per experiment) it seemed superfluous to correct our results with respect to concentration.

The same procedure was followed with muscle tissue from a non-injected rat; the total respiration in 2 hours of the two pulp samples was compared.

Table I shows that in both cases different results were obtained. The total sum of the oxygen consumed in 2 hours by the muscle of the treated rat may be less than, equal to, or

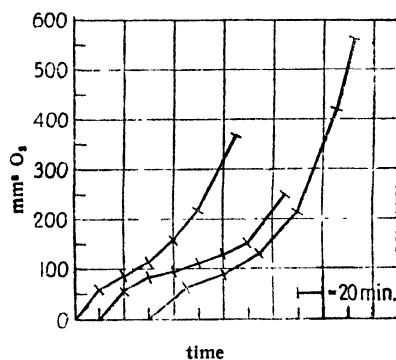


Fig. 1. Oxygen consumption of muscle pulp (3 experiments).

\*) When measured with NOYONS's diaferometer tissue respiration is always found to remain constant for hours (JONGBLOED<sup>3)</sup>).

TABLE I.

Number of experiment	control		adrenaline		hours after injection
	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> /mg dry muscle	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> /mg dry muscle	
I.	160 } 159 } 169 }	1.09 } 1.20 } 1.20 }	219 } 220 } 197 }	1.57 } 1.51 } 1.35 }	½
II.	196 } 206 } 210 }	3.84 } 3.81 } 3.88 }	141 } 144 } 156 }	2.28 } 1.60 } 1.81 }	½
III.	219 } 173 } 238 }	3.37 } 4.70 } 3.21 }	126 } 133 } 192 }	1.55 } 2.10 } 1.70 }	¾
IV.	78 } 100 } 101 }	1.00 } 1.32 } 1.30 }	112 } 122 } 140 }	1.41 } 1.50 } 1.63 }	¾
V.	205 } 163 } 278 }	3.66 } 3.46 } 3.39 }	92 } 106 } 86 }	1.56 } 1.80 } 1.26 }	1½
VI.	122 } 146 } 137 }	1.80 } 2.15 } 1.83 }	159 } 145 } 147 }	2.00 } 1.81 } 2.00 }	1½
VII.	165 } 141 } 136 }	2.42 } 1.76 } 1.86 }	313 } 321 } 317 }	4.61 } 4.06 } 4.22 }	2

TABLE II.

Number of experiment	control		adrenaline	
	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> /mg dry muscle	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> /mg dry muscle
I.	137 } 113 } 150 }	1.96 } 1.59 } 2.03 }	157 } 196 } 150 }	1.78 } 2.44 } 1.67 }
II.	93 } 147 } 100 }	1.37 } 1.75 } 1.67 }	476 } 476 }	6.10 } 6.10 }
III.	144 } 149 } 162 }	1.80 } 1.99 } 2.22 }	373 } 385 } 381 }	6.22 } 5.50 } 5.01 }
IV.	78 } 100 } 101 }	1.00 } 1.32 } 1.30 }	96 } 106 } 124 }	1.41 } 1.50 } 1.63 }

more than the amount consumed by the control muscle. About the same was shown to be the case, when the adrenaline was given by means of perfusion of the hindlimbs of a rat through the cannulated aorta abdominalis with an adrenaline-containing KREBS solution (table II).

The study of the respiration during the experimental period yielded the explanation.

If the aforementioned increase of the oxygen consumption occurs after the experimental period, both muscles consume approximately the same amount of oxygen. If, by chance, the respiration curve assumes its upward course during the experimental period in one of the samples of muscle tissue, this muscle will consume much more oxygen than the other one. We received the impression that as a rule this reversal of the respiration curve appears sooner after adrenaline treatment (for a possible explanation see below under III). As, however, considerable spontaneous variations are possible in non-treated muscles, the control muscle may sometimes show the reaction sooner than the experimental one, which results in a larger final oxygen consumption.

In numerous experiments with muscle pulp, with or without previous treatment with adrenaline, the effect could be reproduced. In fact, it never failed to appear under the conditions of our experiments.

Rather than continuing our investigations on the mechanism of the action of adrenaline we therefore started the study of this strange conduct of muscle pulp. A series of questions immediately presented themselves:

1. Is the effect confined to muscle cells or is it more general?
2. Is the augmentation of the oxygen consumption due to bacterial influences?
3. Can one consider the effect as to be solely based upon respiration, i.o.t. is carbondioxide produced in amounts corresponding with the combustion either of carbohydrates, fats or proteins and what is the nature of the substrate that is consumed?

4. Is the effect caused by an alteration of the muscle cells, or rather by change in the suspension medium?

5. Which kind of respiration prevails during the period of the augmentation effect? (Hemin, flavin or another respiratory system).

We hope to be able to answer at least some of these questions in the following.

### I. Pulp of different organs.

The pulp was prepared from a number of organs in the way as described above for muscle tissue. The concentration varied from 20—40 mg/ccm of suspension.

Figs. 2a and 2b show the results obtained with liver, heart, stomach, intestine, spleen, kidney and brain. Pulp from the former four organs shows a pronounced increase of

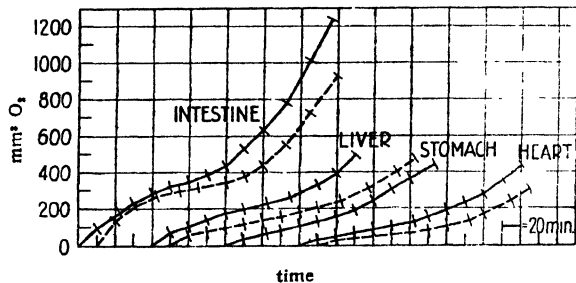


Fig. 2a. Oxygen consumption by pulp of organs capable of glycogen storage (intestine: 2 experiments, liver: 2 exp., stomach: 1 exp., heart: 2 exp.). Flexing point present.

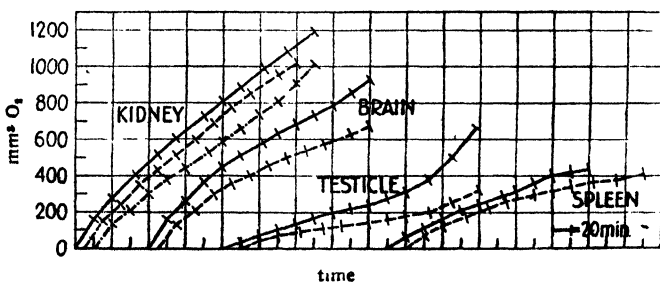


Fig. 2b. Oxygen consumption by pulp of organs not capable of glycogen storage (kidney: 3 exp., brain: 2 exp., testicle: 2 exp., spleen: 2 exp.). Flexing point absent.

oxygen consumption in the course of the experiments; the result with testicle pulp is uncertain, whereas it is negative in the case of the latter three organs. It is remarkable that positive results were obtained with organs which are capable of storing glycogen (liver, striated and smooth muscle) whereas the organs which as a rule are free of any appreciable amount of glycogen do not

show the effect. As will be shown in § IV, relations exist between glycogen accumulation and the oxygen augmentation effect.

**II. Influence of micro-organisms.** Since some of the experiments take rather a long time (several hours), the question may be raised whether bacterial deterioration is accountable for the observed effect. This question is all the more self-evident, because the existing conditions (37°, tissue pulp) certainly favour the development of yeasts and bacteria.

It may be remarked, however, that in most cases at any rate the flexing point of the respiration curve appears before the period of two hours, common to many other respiration experiments, has elapsed, even though the main part of the effect may occur at a more suspect time (after 3–4 hours).

Nevertheless some experiments were performed in which 2 drops of tricresol were added to 75 ccm of tissue suspension. Fig. 8 shows that this addition did not prevent the effect, which proves that the effect is not caused by bacterial infection.

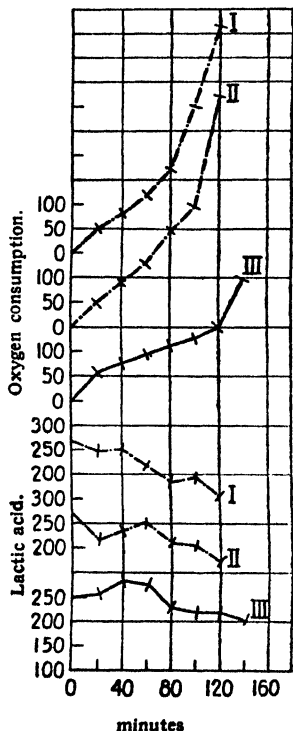


Fig. 4. Relation between oxygen consumption and concentration of lactic acid (3 exp.). No relation.

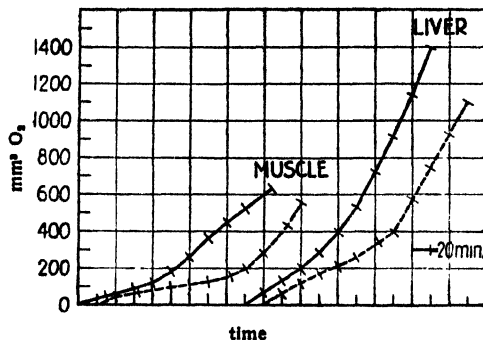


Fig. 8. Influence of tricresol (muscle: 2 exp., liver: 2 exp.). Flexing point present.

**III. Production of carbondioxide. The substrate.** The respiratory quotient during the period of augmented oxygen-consumption was determined according to WARBURG, with a slight modification by using nitrogen instead of argon during the determinations of the bound carbondioxide, as previously described by OVERBEEK<sup>3</sup>).

The experiment was not started until the increase of the velocity of oxydation was fully established (first determination of bound carbondioxide).

The results of 5 experiments gave a RQ of 1.08, 1.17, 1.37, 0.96 and 1.07. The quotient appears to be about 1, indicating that either carbohydrate or lactic acid is combusted and that a true respiration exists.

Investigations on the nature of the combusted substrate were started but did not as yet lead to a definite result. The oxidation of glucose is improbable, as no glucose was added and the glycogenolysis of muscle glycogen yields lactic acid and no glucose! In fact, only very small amounts (which are moreover almost constant later on!) of reducing substances could be shown to be present at the beginning of the experiment (HAGEDORN-JENSEN's method after deproteinization of the suspension as a whole).

Determinations of lactic acid (MILLER and MUNTZ<sup>7</sup>) were made at different times of the experiment. There is a tendency to a decrease during the reaction period but no drop occurs simultaneously with the increase of oxygen consumption, as could be expected if lactic acid served as a substrate (fig. 4).

As a matter of fact the possibility exists that the augmented oxygen consumption is accompanied by an increased production of lactic acid which is immediately combusted. This would conflict with the PASTEUR-MEYERHOF reaction which implies that glycolytic phenomena are inhibited by augmented oxidations.

Furthermore this possibility could be experimentally excluded: the addition of sodium

fluoride which is known to prevent the formation of new lactic acid, did not inhibit the oxygen consumption (fig. 5).

A non-reducing decomposition product of glycogen with a carbohydrate structure must therefore be considered as the most probable substrate. The only known substance fulfilling these requisites is the glucose-1-phosphoric ester of CORI c.s. 8). This substance might accumulate during the initial part of the process and be combusted during the latter.

Such an accumulation might for instance be expected after the injection of adrenaline, which is known to increase the hexosephosphate content of the muscle (CORI and CORI 9)). In fact we received the impression (see above) that previous treatment of the rat with adrenaline favours the appearance of the effect.

Determinations of CORI-ester must render the solution. These experiments are in preparation and will be reported in due time.

**IV. Alteration of cells or medium?** Several possibilities may be suggested on account of the alterations occurring in the described system. They are either limited to the cells, or an inhibitory substance disappears by diffusion, or, finally, a stimulating substance is formed in the medium.

It may be remarked that the LATAPIE mill separates most of the cells of the organ that is ground without destroying them, which is readily revealed upon microscopical examination of the suspension. In addition to scarce conglomerations of 10–20 cells, the preparation contains large masses of single, duple or triple cells.

In order to elucidate this point, we separated cells and medium in the initial as well as in the final phase of the experiment by pipetting off the fluid as completely as possible. The cells were washed with KREBS solution after which a quantity of fresh solution was added, equal to that of the removed medium.

On the other hand the fluid derived from the actively respiring cells was added to muscle cells in the initial phase.

Fig. 6 shows that no appreciable effect of the medium on either of the samples of muscle cells could be shown. This result renders it highly probable that the main part of the reaction occurs in the cell and

that changes of the medium are negligible. (This does not conflict with our conclusions in the preceding paragraph because the hexosephosphates are chiefly found in the cells).

We therefore directed our research to chemical alterations in the cells, which could indeed be demonstrated. Save to the above-mentioned CORI-ester, our interest went out to the changes in the glycogen content. The experiments being performed at 37°, a strong glycogenolysis could be expected, and it seemed possible that at the starting-point of the increase in the oxygen consumption the scarcity of glycogen would result in the appearance of an entirely different metabolic process, beside the ordinary respiration.

However, the disappearance of glycogen during the experimental period proved to be a

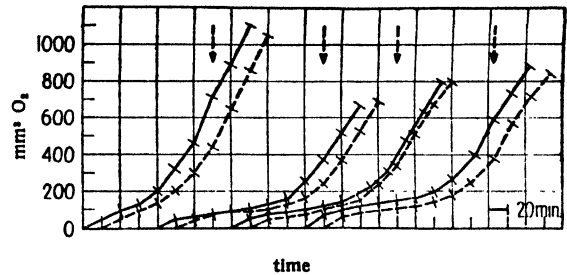


Fig. 5. Influence of NaF. (4 exp. — = no fluoride; - - - = 3 mg NaF added at ↓ to 2 ccm suspension). No influence.

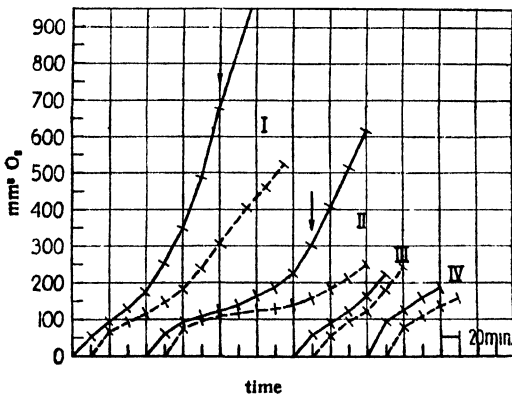


Fig. 6. Influence of the addition of fresh KREBS solution at ↓ resp. ↓ (exp. I and II). Influence of the addition of removed medium at ↓ resp. ↓ to fresh muscle pulp. (exp. III and IV). No influence.



much slower process than we expected to find. There even was a small but unmistakable augmentation of the glycogen content following the initial decline (fig. 7).

Glycogen was determined by the method of PFLÜGER. The amount of material from the respiration vessels being too small, 4 ccm of the suspension was shaken in 100 ccm ERLÉNMEYER-bottles at 37° and at the same speed as the respiration vessels; a respiration experiment with the same muscle suspension running simultaneously. With this procedure it was possible to take the ERLÉNMEYER-bottles out at the desired time. Solid potassium hydroxide was added up to a concentration of 30% and hydrolysis was carried out in the usual way.

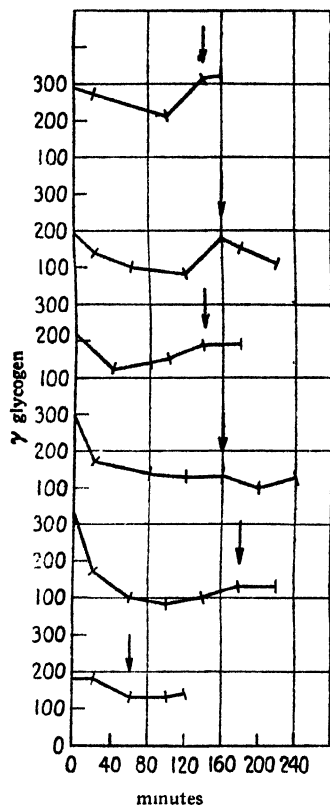


Fig. 7. Glycogen content of 4 ccm suspension. The arrow indicates the flexing points in the (omitted) respiration curve. Glycogenolysis decreases and is reversed in synthesis.

However, the amount of material available was still too small to permit duplicate determinations of the individual samples and the obtained accuracy was rather poor, as is shown by the following series of eight simultaneous determinations in 4 cc of a same muscle suspension (0.135, 0.162, 0.150, 0.140, 0.190, 0.125, 0.135, 0.102). This large variation may cause considerable doubt as to the reliability of our conclusion that the glycogen content increases during the experiment. We therefore stress the point that in every case of fig. 7, the glycogen values at the end of the experiment are higher than those in the intermediate period, which we consider to be incompatible with the occurrence of accidental variations. If real, this increase of the glycogen content is in complete accordance with the augmented respiration, which will furnish the required energy, as well as with the above-mentioned possible accumulation of CORI-ester which easily yields glycogen when present in large amounts (OSTERN c.s. 10), CORI c.s. 11)).

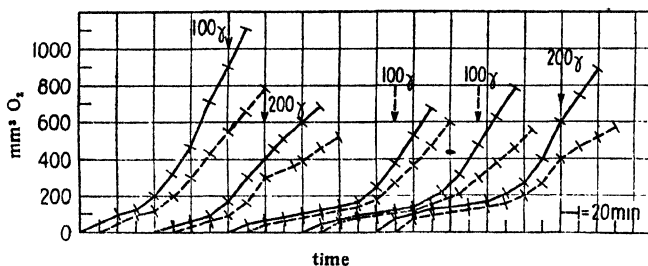
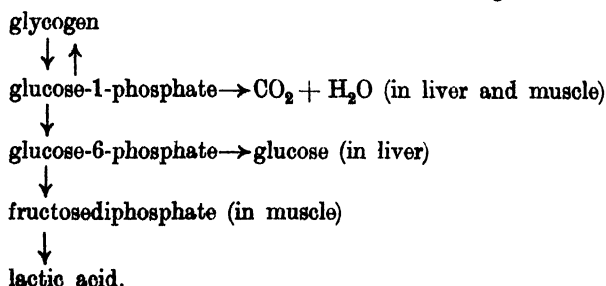


Fig. 8. Influence of cyanide. (— = no cyanide; ---- = 100 resp. 200 γ KCN added at ↓ to 2 ccm suspension). Moderate inhibition.

This might suggest the hypothesis that the formation of glucose-1-phosphate is the first step in oxidation reactions in liver and muscle, according to the following outline:



**V. The respiratory system.** It seemed of interest to acquire some knowledge of the nature of the system that causes this large oxygen consumption. We therefore studied the influence of cyanide.

Potassium cyanide was added in amounts of 100 and 200  $\gamma$  when the full augmentation effect could be observed.

Fig. 9 shows that only a moderate inhibition occurred (100  $\gamma$  KCN inhibited on the average 37%, 200  $\gamma$  KCN 55% of the oxygen consumption). These amounts of cyanide would inhibit a hemin respiration for at least 90% (12).

The large oxygen consumption therefore cannot be caused by the activity of a hemin system sensible to cyanide. Other systems have not been investigated as yet.

We may remark that the muscle contains much less flavin than the liver. Therefore if a flavin system would play a part one would expect a larger effect in the experiments with liver pulp, which is not the case (see § I).

Other possibilities await further investigations.

### Discussion.

A peculiar phenomenon, *viz.* a large increase of the oxygen consumption and carbon-dioxide production was observed after shaking pulp from glycogen containing organs for some time at 37°.

It is obvious that this effect has nothing to do with any process occurring *in vivo*. Most probably it is an entirely artificial phenomenon. Nevertheless it seems important for the study of carbohydrate metabolism, because in this artificial way conditions are created, under which glycogen synthesis is possible. The experiments therefore seem to bear relation with those of OSTERN and of CORI (l.c.). These authors could observe a synthesis of glycogen in liver and muscle after eliminating the action of either phosphatase, which dephosphorylates the glucosephosphate (in liver), or of adenylypyrophosphate which adds a second molecule of phosphoric acid to it in muscle tissue). Perhaps we succeeded in obtaining the same result by the simple aerobic shaking of tissue pulp. The variation in the time at which the effect appears spontaneously after previous treatment with adrenaline is easily explained by assuming that an appreciable amount of glucose-1-phosphate must be present before the augmentation effect appears.

Finally these investigations show that any respiration experiment whatever can easily be disturbed by the above described phenomenon; hence it is necessary to follow the course of the respiration and not to confine oneself to the determination of the total oxygen consumption, as has been frequently done by earlier investigators.

### Summary.

1. By shaking tissue pulp at 37° an initial decrease of the respiration followed by an appreciable increase of the oxygen consumption is induced.

2. This effect occurs with organs containing glycogen (liver, heart, stomach and intestine) but as a rule not with other organs (spleen, kidney, brain). The results with testicle are uncertain and as yet unexplained.

3. The effect is caused by intracellular processes and not by alterations of the medium. Deterioration by micro-organisms could be excluded.

4. The respiratory quotient is about 1. The substrate is neither glucose nor lactic acid, but possibly glucose-1-phosphate.

5. The increase of the respiration is accompanied by an increase of the glycogen-content (at least in muscle).

6. The effect is only moderately inhibited by cyanide.

7. The effect may be valuable for the study of the reactions occurring in glycogen synthesis and glycogenolysis.

- 1) A. v. Szent Györgyi, *Studies on biological oxidations*, J. A. Barth, Leipzig, 1937. — 2) G. A. Overbeek, *Rec. Trav. chim.* **58**, 1018 (1939). — 3) J. Jongbloed, *Acta Brev. Neerl.* **11**, 57 (1941). — 4) S. Soskin, W. S. Priest, W. J. Schutz, *Amer. Jl. Phys.* **108**, 107 (1934). — 5) C. F. Cori, G. T. Cori, *Jl. of Biol. Chem.* **79**, 343 (1928). — 6) H. A. Krebs, K. Henseleit, *Zs. physiol. Chem.* **210**, 33 (1932). — 7) B. F. Miller, J. A. Muntz, *Jl. of Biol. Chem.* **126**, 413 (1938). — 8) G. T. Cori, S. P. Colowick, C. F. Cori, *ibid.* **121**, 468 (1937). — 9) C. F. Cori, G. T. Cori, *ibid.* **94**, 581 (1931—'32). — 10) P. Ostern, D. Herbert, E. Holmes, *Biochem. Jl.* **33**, 1858 (1939). — 11) G. T. Cori, C. F. Cori, G. Schmidt, *Jl. of Biol. Chem.* **129**, 629 (1939). — 12) O. Warburg, *Biochem. Zs.* **172**, 432 (1926).

# Katalytische Oxydation von Sulfiden durch Hämin oder Hämoglobin

VON

F. HAUROWITZ

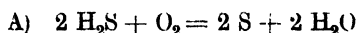
(Unter Mitarbeit von M. MUTAHHAR YENSON und P. SCHWERIN)

(Mediz.-chem. Inst. der Univ. Istanbul).

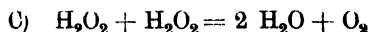
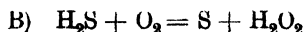
(18.III.41.)

Die Dehydrierung von Sulfiden durch molekularen Sauerstoff zu Schwefel wird von Hämin katalysiert (KREBS<sup>1</sup>). Die gleiche Wirkung lässt sich auch durch Hämoglobin erzielen (Versuch 1). Wir haben diese Reaktion näher untersucht, weil es sich um ein besonders einfaches Substrat handelt und um einen Katalysator, der als Repräsentant der biologisch wichtigen Katalysatoren von Hämintypus angesehen werden kann. Dabei haben wir folgende Beobachtungen gemacht:

1. Bei Gegenwart eines Überschusses an  $O_2$  wird bei der durch Hämin katalysierten Dehydrierung auf je 2 Moleküle  $H_2S$  nur 1 Molekül  $O_2$  verbraucht (Versuch 2), dann nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit sehr wesentlich ab; neben molekularem Schwefel entstehen nur kleine Mengen Sulfat (Versuch 3). Die Oxydation verläuft daher nach der Brutto-gleichung A:



2. Unter den im Versuchsteil beschriebenen Bedingungen werden durch 1 Mol. Hämin in 60 Minuten etwa 100—200 Äquivalente  $H_2S$  zu S dehydriert. Lässt man unter den gleichen Bedingungen Hämin auf  $H_2O_2$  einwirken, so werden von 1 Mol. Hämin in 60 Minuten 90—120 Äquivalente  $H_2O_2$  katalytisch zersetzt (Versuch Nr. 5). Die Grössenordnung der beiden Reaktionsgeschwindigkeiten ist also gleich. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass an Stelle der trimolekularen Reaktion A) die beiden bimolekularen Reaktionen B) und C) treten:



Dies stimmt mit Beobachtungen von SCHALES<sup>2</sup>) überein, der bei der Dehydrierung von  $H_2S$  die Bildung von Peroxyd nachgewiesen hat.

3. Im System  $H_2S + O_2 +$  Hämoglobin besteht kein direkter Zusammenhang zwischen Dehydrierung und Bildung von Sulfhämoglobin. Die Dehydrierung verläuft bei pH 7,7 schneller als bei pH 5,7, die Sulfhämoglobin-Bildung langsamer (Versuch Nr. 4).

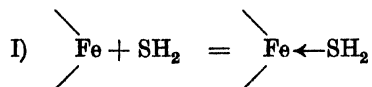
Sulfhämoglobin wurde wegen seiner grünen Farbe in letzter Zeit von mehreren Forschern als Verdohämochromogen angesprochen. Eigene Untersuchungen, über die an anderer Stelle berichtet wird, haben jedoch gezeigt, dass Sulfhämoglobin ebensoviel Eisen enthält wie Hämoglobin, dass dieses Eisen ebenso fest gebunden ist und dass kein Anzeichen für eine Öffnung des Porphyringes und für den Übergang in ein Gallenfarbstoff-Derivat besteht (3, 4). — Die Reaktionsgeschwindigkeit der Dehydrierung ist bei der Hämoglobin-Katalyse von der gleichen Grössenordnung wie bei der durch Hämin katalysierten Dehydrierung des Schwefelwasserstoffes. Aber es wird weniger als 1 Molekül  $O_2$  auf je 2 Moleküle  $H_2S$  verbraucht. Dies zeigt, dass ein Teil des Schwefelwasserstoffes an Hämoglobin gebunden oder von bestimmten Atomgruppen des Hämoglobins oxydiert wird, zum Beispiel von den Dithiogruppen des Cystins.

4. Schüttelt man Lösungen von Hämin oder Hämoglobin mehrere Stunden mit einem grossen Überschuss an  $H_2S$  und  $O_2$ , so wird allmählich der Blutfarbstoff zerstört. Dies äussert sich in einer Abnahme der Lichtabsorption und in einer Zunahme des leicht abspaltbaren Eisens (Versuch Nr. 6). Die langsame Zerstörung des Blutfarbstoffes beruht offenbar

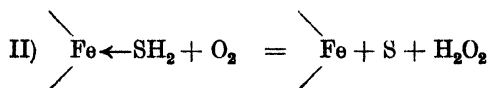
auf einer Spaltung des Porphingerüsts durch das intermediär entstehende Wasserstoffperoxyd. Sie hat mit der schnell verlaufenden Bildung des Sulfaämoglobins nichts zu tun (4).

### Mechanismus der Hämin-Katalyse.

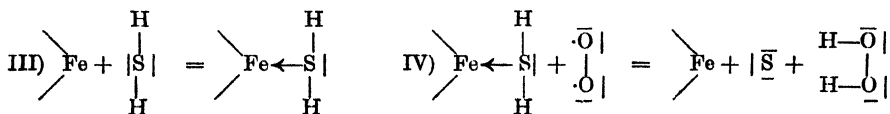
In einer früheren Mitteilung (5) war nachgewiesen worden, dass Hämin eine labile Verbindung mit Wasserstoffperoxyd bildet und dass in Gegenwart von Hämin das Reduktionspotential des Wasserstoffperoxyds an der tropfenden Hg-Elektrode herabgesetzt ist. Daraus geht hervor, dass das  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Molekül durch Bindung an Hämin „aktiviert“ wird. Bei diesen Untersuchungen war bereits festgestellt worden, dass das Reduktionspotential des  $\text{O}_2$ -Moleküls durch Hämin nicht verändert wird. Hämin scheint also nicht imstande zu sein, das  $\text{O}_2$ -Molekül zu aktivieren. Bei der Reaktion zwischen  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{O}_2$  wird offenbar das  $\text{H}_2\text{S}$ -Molekül durch Hämin aktiviert. Wahrscheinlich bildet sich auch hier eine koordinative Verbindung durch Anlagerung von  $\text{H}_2\text{S}$  an das Fe-Atom des Blutfarbstoffes. KEILIN (6) hat als erster eine solche Verbindung zwischen  $\text{H}_2\text{S}$  und Methämoglobin nachgewiesen. Nun wird jedoch Hämin durch  $\text{H}_2\text{S}$ , wie aus dem Farbumschlag und dem spektroskopischen Befund hervorgeht, sofort zu Häm reduziert. Deshalb nehmen wir Anlagerung von  $\text{H}_2\text{S}$  an die Ferro-Verbindung Häm an (I):



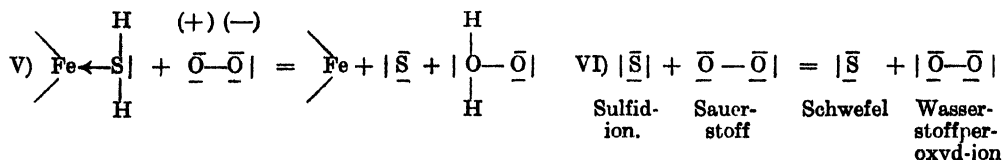
Durch die koordinative Bindung des Sulfid-Moleküls an das Porphyrin-Eisen werden die „einsamen Elektronenpaare“ des S-Atoms offenbar so weit entkoppelt (7), dass 2 Elektronen an die Elektronenlücke des  $\text{O}_2$ -Moleküls abgegeben werden und dieses dadurch reduziert wird (Gleichung II):



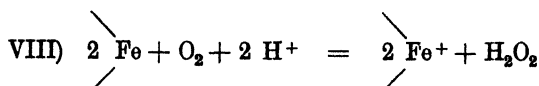
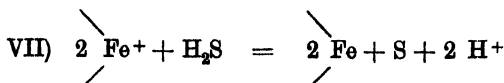
Man kann die zwischen  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{O}_2$  erfolgende Reaktion deutlicher zum Ausdruck bringen, wenn man nach einem Vorschlage von ARNDT und EISTERT (7) die in den üblichen Formeln nicht gezeichneten einsamen Elektronenpaare der äussersten Elektronenschale durch Querstriche, Einzel-elektronen (= Radikalstellen) durch Punkte, koordinative Bindungen durch Pfeile vom Donator des Elektronenpaares zum Acceptoratom darstellt. Die bindenden Elektronenpaare werden in üblicher Weise durch Valenzstriche zwischen den verbundenen Atomen zum Ausdruck gebracht. Setzt man für das Sauerstoff-Molekül wegen seiner bekannten starken paramagnetischen Suszeptibilität die Di-radikal-formel ein, so treten an Stelle der Gleichungen I und II die Gleichungen III und IV:



Die Reaktion zwischen  $\text{H}_2\text{S}$  und  $\text{O}_2$  wird noch besser verständlich, wenn man an Stelle der üblichen di-radikalischen Formel des Sauerstoffes die mesomere zwitterionische Formel einsetzt. Dann entsteht die bereits früher von uns (5) angenommene tautomere Form des Wasserstoffperoxyds (V); der eigentliche Reduktionsvorgang besteht danach in einer einfachen Wanderung eines Elektronenpaares vom S-Atom zum O-Atom nach Gleichung VI:



Unsere eben entwickelte Anschauung unterscheidet sich wesentlich von der herrschenden Auffassung, nach welcher ein ständiger Valenzwechsel am Fe-Atom nach Gleichung VII und VIII angenommen wird.



Gleichung VII und VIII stellen trimolekulare Reaktionen dar, sind daher wenig wahrscheinlich. Um sie zu umgehen, müsste man bei VII als Zwischenprodukt ein Radikal  $\dot{\text{S}}\text{H}$  und bei VIII ein Radikal  $\dot{\text{O}}\text{-O-H}$  annehmen. Derartige Radikale sollten sich leicht mit einander vereinigen und dadurch zur Bildung von Sulfid und Sulfat führen. Tatsächlich entstehen aber bei der Dehydrierung von  $\text{H}_2\text{S}$  durch  $\text{O}_2$  und Hämin nur kleine Mengen Sulfat neben grossen Mengen von Schwefel. Gegen einen Valenzwechsel am Eisen spricht auch die Untersuchung von KREBS <sup>1)</sup>, der unter anderem festgestellt hat, dass die Dehydrierung des Schwefelwasserstoffes auch durch  $\text{NiSO}_4$  und durch  $\text{CoSO}_4$  katalysiert wird. Keine dieser beiden Substanzen wird durch Sauerstoff oxydiert. Wir ziehen daher den Gleichungen VII und VIII die oben entwickelten Gleichungen I und II vor und nehmen an, dass der Sauerstoff nicht das Metall-Ion oxydiert, sondern das vom Metall-Ion polarisierte Substrat. Es ist dazu notwendig, dass Substrat und Katalysator einander genügend nahe kommen, damit der polarisierende Einfluss des Metallatoms wirksam wird. Dabei kann eine echte koordinative Bindung zustandekommen, scheint aber nicht erforderlich zu sein. Diese Frage wird derzeit an anderen Häminkatalysen untersucht.

### Versuche.

**1. Oxydation von  $\text{H}_2\text{S}$  zu S.** 500 ccm einer 9,8 %igen Lösung von kristallisiertem Pferde-Oxyhämoglobin wurden 12 Stunden lang mit einem Gemisch von 1 Liter  $\text{H}_2\text{S}$  und 0.5 Liter  $\text{O}_2$  geschüttelt; nun wurde evakuiert und das Schütteln mit dem Gasgemisch noch 2 mal wiederholt. Dann wurde abzentrifugiert, der Niederschlag mit n/10-Essigsäure gewaschen, bei 110 Grad getrocknet, gewogen (= 19,0 g). Er enthält 29 % S (42,0 mg = 88,0 mg  $\text{BaSO}_4$ ); durch siedendes Benzol liess sich der grösste Teil des Schwefels in Lösung bringen.

**2. Messung des  $\text{O}_2$ -Verbrauches.** In die Hauptgefässe einer Reihe von WARBURG-Gefässen kamen je 1,25 ml. m/5-Phosphatpuffer ph 5,7 und steigende Mengen Hämin, gelöst in 1 ml. n/10 NaOH; die Seitengefässe enthielten 1 ml. n/20- $\text{H}_2\text{S}$ -Wasser (= 0,05 Milli-Aquivalente  $\text{H}_2\text{S}$ ). Nach dem Temperaturausgleich wurde gekippt und bei Zimmertemperatur geschüttelt. Tabelle I zeigt, dass die Reaktion stehen bleibt, wenn etwa 280—320 ccm  $\text{O}_2$  aufgenommen sind, das sind 0.052—0.060 Milli-Aquivalente  $\text{O}_2$ .

TABELLE I.  
Volumen in cmm (25°, 753 mm).

Minuten	$\gamma$ Hämin:	0	3,9	15,6	31,2	62,5	125	250	1000
8		+14	+34	+16	+23	+14	+15	+23	-2
18		+10	+31	+10	-1	-42	-75	-120	-183
28		+2	+18	-10	-35	-96	-153	-216	-249
38		-5	+11	-28	-61	-138	-267	-258	-253
68		-12	-17	-73	-128	-224	-279	-281	-250
98		-14	-38	-107	-172	-273	-303	-292	-253
128		-15	-56	-136	-208	-299	-309	-282	-244
158		-18	-70	-159	-240	-314	-306	-281	-252
188		-24	-85	-178	-264	-321	-305	-281	-252
A: qu. $\text{O}_2$ : A qu. Hämin			216	187	690	510	313	148	30

Die anfängliche geringe Volumenzunahme beruht wahrscheinlich darauf, dass aus der alkalischen Hämoglobinlösung durch den Puffer kleine Mengen  $\text{CO}_2$  entwickelt werden.

**3. Bildung von Sulfat.** 2,5 mg Hämin wurden in 2,5 ml. n/10-NaOH mit 7,5 ml. Wasser, 10 ml. 0,05 n- $\text{H}_2\text{S}$  und 12,5 ml. m/5-Puffer ph 5,7 eine Stunde lang geschüttelt, dann mit HCl angesäuert, vom ausfallenden Hämin und Schwefel abfiltriert, gewaschen und im klaren Filtrat das Sulfat durch Zusatz

von Chlorbarium gefällt. Gef. 8,98 mg  $\text{BaSO}_4$ . Mit Phosphatpuffer ph 7,7 (anstatt 5,7) wurden nur 1,12 mg  $\text{BaSO}_4$  gefunden.

**4.  $\text{O}_2$ -Verbrauch und Sulfhämoglobin-Bildung.** In die Hauptkammern der WARBURGgefäße kamen 2 ml. m/5-Phosphatpuffer + 0,5 ml. Wasser + 0,5 ml. einer Hb-Lösung, die aus Kaninchen-Erythrocyten durch Hämolyse mit Wasser, Zusatz von 1 % kristall. NaCl und Abscheuern der Schatten gewonnen war. In Kontrollversuchen wurde Hb durch 1 % NaCl-Lösung ersetzt. Die Seitengefäße enthielten 1 ml. 0.05-n-Schwefelwasserstoffwasser.

TABELLE II.

Nr.	Katalysator	ph des Puffers	$\text{O}_2$ -Verbrauch in $\text{mm}^3$			
			t = 30'	60'	90'	120'
1	5,4 % Hb	5,7	—56	—108	—140	—167
2	"	6,7	—157	—214	—225	—231
3	"	7,7	—161	—198	—202	—209
4	2,7 % Hb	5,7	—20	—64	—90	—115
5	"	6,7	—122	—179	—204	—219
6	"	7,7	—136	—194	—209	—218
7	Kontrolle	5,7	+28	+23	+18	+15
8	"	6,7	+11	+4	—4	—12
9	"	7,7	—7	—13	—33	—42

Nach Beendigung des Versuches war Versuch Nr. 1 grün gefärbt und zeigte spektroskopisch intensive Absorption im Rot neben zwei kaum merklichen Banden im Grün. Dies entspricht fast vollkommener Umwandlung in Sulf-Hb. Lösung Nr. 2 und 3 waren braun und zeigten neben dem Spektrum des Sulf-Hb deutlich die beiden Streifen des  $\text{O}_2\text{Hb}$ . Im PULFRICHschen Stufenphotometer waren die Extinktionskoeffizienten bei Farbfilter  $S_{61}$  und 5 mm Schichtdicke im unbehandelten Ansatz zu Versuchsbeginn 0.04; in Lösung 1 = 0.595; in Lösung 2 = 0.505; in Lösung 3 = 0.42.

**5. Zersetzung von Wasserstoffperoxyd durch Hämin.** In die Hauptgefäße der WARBURG-Apparatur kamen je 0,5 ml. einer 0,2 %igen Lösung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0,1 n-NaOH und 1,25 ml. 0,2 -m Phosphatpuffer ph 5,7 (nach SÖRENSEN), in die Seitengefäße je 1 ml. 0,1 n-NaOH mit steigenden Mengen Hämin. Die unterste Zeile der Tabelle III gibt die von je 1 Mol. Hämin in 65 Minuten zersetzten Mengen Wasserstoff-Peroxyd an, und zwar in Äquivalenten  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf je 1 Äquivalent Hämin.

TABELLE III.

Volumszunahme in  $\text{mm}^3$  (t = 24°, p = 754 mm).

Minuten	Häminmenge in $\gamma$ :					
	0	62,5	125	250	500	1000
6	5	9	10	10	5	15
12	5	—	—	101	172	204
35	8	56	136	215	291	295
65	6	53	155	241	287	292
$\text{H}_2\text{O}_2$ : Hämin	—	91	135	103	61	31

**6. Zerstörung von Hämin und Hämoglobin durch einen Überschuss von Schwefelwasserstoff und Sauerstoff.** 35 ml. einer 0,45 %igen Lösung von Hämoglobin wurden 12 Stunden mit 800 ml. Sauerstoff und 600 ml. Schwefelwasserstoff in geschlossener, 1 Liter fassender, Flasche geschüttelt, dann in einem Teil des Ansatzes das leicht abspaltbare Eisen nach BARKAN <sup>8)</sup> im Trichloressigsäurefiltrat bestimmt. Im Kontrollversuch wurde die Hämoglobininlösung nur mit Luft geschüttelt. Das Hämoglobin war in einigen Versuchen nach Abschn. 1 aus Kaninchen-Blutkörperchen durch Hämolyse gewonnen; in anderen Versuchen wurde umkrystallisiertes Hämoglobin vom Meerschweinchen verwendet. Nach 12-stündigem Schütteln mit dem Gasgemisch waren 64 % (Kaninchen) beziehungsweise 79 % (Meerschweinchen) des Gesamteisens leicht abspaltbar, im Kontrollversuch (Kaninchen) nur 26 %. Je 4 ml. des Ansatzes wurden mit 4 ml. 1 % NaOH am Wasserbad erhitzt bis der abgeschiedene Schwefel in Lösung gegangen war, dann 4 ml. 10 % KCN zugefügt und die hellrote Lösung des Cyan-

derivates photometriert. Wir fanden im PULFRICHschen Stufenphotometer mit Filter  $S_{43}$  und 5 mm-Küvette im Hauptversuch  $E = 2,1$ , im Kontrollversuch  $E = 3,2$  (Kaninchen-Hämoglobin).

20 mg Hämin wurden in 100 ml. n/10-NaOH gelöst und 12 Stunden mit 900 ml. des Gasgemisches aus  $H_2S$  und  $O_2$  geschüttelt. Zur Bestimmung des leicht abspaltbaren Eisens wurde ein Teil des Ansatzes mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, dann Fe nach KENNEDY<sup>9)</sup> kolorimetrisch bestimmt. Es waren 0,90 mg Fe leicht abspaltbar, das sind 51 % des gesamten Hämineisens. 10 ml. des Ansatzes wurden zur Photometrie mit 1 ml. 40 % NaOH im Wasserbade erhitzt. Mit Filter  $S_{43}$  und 5 mm-Küvette fanden wir zu Versuchsbeginn  $E = 2,55$ , nach 12 Stunden Schütteln mit dem Gasgemisch  $E = 1,92$ .

### Summary.

The dehydrogenation of  $H_2S$  by  $O_2$  in the presence of hemin or of hemoglobin leads to the intermediate formation of  $H_2O_2$  (Reactions I and II). If small amounts of hemoglobin are treated with a large excess of  $H_2S$  and  $O_2$ , the dye molecules are destroyed, apparently by  $H_2O_2$ .

The catalytic effect of hemin and hemoglobin on the dehydrogenation is attributed to the polarising effect of their iron atoms on the sulfur atom of sulfide. The polarised sulfur atom delivers one of its lone electron pairs to the oxygen molecule, reducing it to hydrogenperoxyde (Reactions V and VI). There is no reason to assume a perpetual change of the valency of the iron atom, nor is there any evidence for the intermediate formation of free radicals

- 1) H. A. Krebs, Bioch. Zs. **204**, 340 (1929). — 2) O. Schales, Ber. Chem. Ges. **71**, 447 (1938). — 3) F. Haurowitz, Oppenheimer's Hdb. d. Biochem., Erg. Werk., Bd. **1**, 382 (1933). — 4) F. Haurowitz, Jl. of Biol. Chem. **137**, 771 (1941). — 5) F. Haurowitz, Enzymol. **2**, 9; **4**, 139 (1937). — 6) D. Keilm, Proc. Roy. Soc. **B 113**, 393 (1933). — 7) B. Eistert, Mesomerie und Tautomerie (1938), S. 74, ferner F. Arndt, B. Eistert, Ber. Chem. Ges. **72**, 202 (1939). — 8) G. Barkan, Klin. Ws. **16**, 300 (1937). 9) R. P. Kennedy, Jl. of Biol. Chem. **74**, 386 (1927).



# Investigations on the aneurin metabolism of the frog, compared to that of the rat

BY

H. G. K. WESTENBRINK AND J. GOUDSMIT

(Labor. of Physiol. Chem., Univ. of Amsterdam)

With 3 figures.

(20.III.41.)

In the last years the aneurin metabolism of various domesticated animals, especially the pigeon and the albino rat, has been investigated. These animals had commonly lived for a long time under laboratory conditions, receiving abundant food of known aneurin content and without being subjected to the immediate influence of the seasons. In view of our purpose to extend these investigations to a less fragmentary biochemistry of this vitamin, several questions present themselves, *viz.*: what are the ratio's of the APP \*) contents of the corresponding organs of various species; are animals living in free nature well provided with this vitamin; what are the variations of the APP content of the tissues during the year, etc.

We have chosen the frog as the chief subject of the present investigation for two reasons:

1st. Wild animals, which can readily be captured in nearly all months and may be supposed to live under quite natural conditions, are not abundant in Holland. The frog is easily caught and we may assume that its food supply is not influenced by the neighbourhood of man.

2nd. The aneurin metabolism has only been investigated in some warm blooded animals, so the study of the frog would also be interesting in this respect that it would furnish the first bit of knowledge of the aneurin metabolism of cold blooded animals.

Our knowledge about the state of the aneurin in animal tissues is only fragmentary. We know that by far the greatest part is present in the form of APP. This has been stated for the rat and the pigeon (1. 1<sup>a</sup>) and it does not seem unlikely that the same holds for all animals. And indeed we have now shown that it holds for the frog. Further it is generally accepted that in animal tissues APP is concerned with the oxidative breakdown of pyruvic acid, in other terms that it is the prosthetic group of the pyruvic acid dehydrogenase, but no general agreement exists concerning the question, whether this enzyme is dissociated or not.

When one proposes to compare the APP contents of the tissues of various species the simple determination of this substance in some tissues of arbitrary individuals, without any knowledge of their food intake, would be of little value. The interesting state, in which the animals should be investigated, is the state, in which the enzyme system of which APP is a part exerts its maximal action. When the enzyme, of which APP is the prosthetic group, is non-dissociated, the state of maximal activity would be the state in which a specific protein, the bearer, has taken up the maximal number of prosthetic groups which it is able to bind. When, on the contrary, this enzyme is dissociated, it would not be possible to define it so accurately; it would then be characterized by the never accurately indicable APP concentration at which the asymptotical part of the dissociation curve is reached.

According to LIPMANN <sup>2)</sup> this enzyme is rather highly dissociated. We do not think, however, that his arguments are conclusive. His reasoning runs as follows: Pyruvic acid is oxidized by *Bact. Delbrückii longissimum* in the same way as by animal tissues. However, the enzyme

\*) APP = aneurinpyrophosphate (cocarboxylase).

system of the bacteria is much less labile than that of animal tissues. Hence the bacteria form a much more adequate subject to study the enzyme system than animal tissues and it will be reasonable to transfer results obtained with the bacteria to the enzyme system, present in animal tissues.

The carboxylase system of yeast, of which APP is also a part, has quite another function than the APP-containing enzyme system (most probably the pyruvic acid dehydrogenase system) of *Bact. Delbrückii* (3). But both systems have this feature in common that APP can only be removed from the dried material by treatment with solutions of pH about 8. From this it should be concluded for the pyruvic acid dehydrogenase — as has been done for the carboxylase —, that it is a non-dissociated enzyme. LIPMANN<sup>2)</sup>, on the contrary, arrives at the opposite result by determining the dissociation curve of alkaline washed dried bacteria. But WESTENBRINK, WILLEBRANDS and KAMMINGA<sup>4)</sup> have shown that results obtained with alkaline washed dried yeast may not be transferred to the native enzyme, present in the non-washed yeast. Indeed they were able to show that the native enzyme is a non-dissociated one, while the enzyme resulting from adding APP to alkaline washed yeast is highly dissociated. Hence, transferring this experience with yeast to lactic acid bacteria, we think that LIPMANN is not justified in concluding from his results with alkaline washed dried bacteria that the native pyruvic acid dehydrogenase of *Bact. Delbrückii* as well as that of animal tissues, is a dissociated enzyme.

Though the tissues of avitaminous animals, which are nearly devoid of APP, are very rapidly supplied again with their normal APP content after the injection of a sufficient quantity of aneurin (1), previous to our experiments with frogs it seemed to be impossible to raise the APP content of animal tissues higher than the content observed in the case of healthy, well-fed animals. This is described by OCHOA<sup>5)</sup> for the APP synthesis by pigeon tissues *in-vitro*. In the same paper OCHOA alludes to unpublished observations by PETERS and himself on the injection of aneurin into pigeons, which confirmed the results of his *in-vitro* experiments. The present authors had already carried out numerous experiments along similar lines with rats. Injecting the enormous dose of 2 mg of aneurin the APP content of the tissues did not seem to have increased significantly. We have now repeated some of these experiments (see table I). We explained these results by assuming that the animal organism did not synthesize more APP than could be bound as a prosthetic group by the available amount of bearer.

Hence, starting the present investigation, we supposed that in comparing the APP contents of analogous tissues of various species, it would be possible to eliminate the influence of the state of nutrition by injecting a large dose of aneurin some hours before killing the animal. The APP content of the tissues would then have its characteristic maximal level, not determined by the amount of aneurin taken in, but solely by the specific properties of the tissues under investigation.

But this appeared to be untrue. Our first observations in this direction were made with frogs. The organs of freshly captured winter-frogs appeared to contain amounts of APP of the order of some  $\gamma$ 's per g, but some hours after the injection of 2 mg of aneurin enormous quantities were found (up to more than 100  $\gamma$ /g in liver and kidney; see table V), amounts which had never been observed with rats. This might be due to a specific difference in APP-binding capacity between the frog and the rat, or to the fact that in ratio to the body weights 2 mg is a much higher dose for the frog than for the rat. The latter explanation was shown to be the right one. When 10 mg of aneurin were injected subcutaneously into the rat, APP contents of the tissues lying much above the normal level were observed (see tables II and III).

Obviously, when very high amounts of APP are administered parenterally much more APP is formed than is commonly found in the tissues. But after about 24 hours, in the case of the frog as well as in the case of the rat the high surplus has disappeared again and amounts, also observed with animals living in conditions of optimal nutrition, result. We might explain these phenomena by assuming, 1st that pyruvic acid dehydrogenase is a non-dissociated enzyme, 2nd that the surplus of APP, formed as a consequence of the injection of an abnormally high amount of aneurin, is not bound to protein and 3rd that this free APP is much more easily attacked by the tissue phosphatases than the protein-bound APP. Special experiments have

already given some confirmation of these hypotheses. They will be continued and published later on. Moreover for yeast WESTENBRINK, WILLEBRANDS and KAMMINGA<sup>4)</sup> have proved already that the protein-bound APP is more resistant to the action of phosphatase than free APP. It is true, the yeast protein seems to be different from the specific animal tissue protein, but the animal- and the yeast symplexes might have this property in common.

We think we must distinguish between „permanent”- and „temporary” APP of the tissues. The „permanent” APP is the APP bound to protein. Probably all APP is „permanent” APP, when no abnormally high amounts of aneurin are suddenly introduced into the organism. Of course the „permanent” APP also disappears gradually, when an animal is restricted to an aneurin-deficient diet. But even under these conditions it is lost much less rapidly by the organism than the „temporary” free APP is lost by animals, living on a food containing ample aneurin. According to our theory the maximal value of the „permanent” APP is characteristic of an organ of a definite species.

So when one proposes to compare the specific APP contents of animal tissues these should be investigated one or two days after the injection of a large dose of aneurin. By this method we were able to show that no essential difference exists between the frog and the rat, only the maximal value of the frog's organs is somewhat lower than that of the rat's. But this should not be considered as a difference between warm blooded- and cold blooded animals, for about the same difference is found between the pigeon and the rat.

Finally some special features of both animals will be pointed out.

The frog. The APP contents of the tissues of summer- and autumn frogs are about equal to the contents of the corresponding tissues about 24 hours after the injection of 2 mg of aneurin. So in summer and autumn the organs of the frogs have the characteristic maximal „permanent” APP content. In winter and spring the APP content is lower, but it does not approach complete disappearance. The metabolism of APP and aneurin during hibernation must be very low. No difference between *R. esculenta* and *R. temporaria* was observed.

Just as with the rat the free aneurin content of the frog's kidney is very high after an aneurin injection. For example in some cases after an injection of 2 mg the kidneys contained about 100  $\gamma$  of aneurin, while they normally only contain negligible amounts (the weight of both kidneys together is about 100 mg). Doubtless this must be brought into connection with the excretion of large amounts of aneurin after the injection. Besides the kidney another road of aneurin excretion seems probable, viz. the skin. Indeed relatively high amounts of aneurin are found in the skin after an aneurin injection (see table VIII), while no aneurin could be detected in it when no injection was given.

The rat. Well nourished rats, e.g. rats fed with full milk powder and whole wheat, have the same APP content as rats, killed one or two days after the injection of 10 mg of aneurin. So their tissues have their characteristic „permanent” APP content. The APP content of the liver and the kidneys of these rats are about equal. But the APP content of the kidneys \*) rises much less after an injection than that of the liver (Table IV). This is probably caused by the higher phosphatase content of the kidneys, by which the „temporary” APP is easily destroyed. We are investigating this point more closely.

### Experimental part.

Most frogs employed were freshly caught. Only a few experiments have been done with frogs, kept during the wintermonths in a shed at the laboratory courtyard. Concerning our provision with frogs we have to record luck as well as ill-fortune. We started our work in the winter of 1939—1940. Though it is commonly impossible to catch frogs in the wintermonths the season was very favourable to this purpose: in the first months of 1940 the water was covered for such a long time with ice and snow that the frogs woke up from the wintersleep in search of oxygen-containing water. They were

\*) The experiments on kidney are not included in table II, as the experiments referred to in this table were performed by means of the thiochrome method A, which is very rapid but not adequate for determining APP in rat's kidney (6).

captured in the nets put in iceholes by fishermen and thus we could secure several freshly captured winterfrogs. The remainder of the year 1940 on the contrary was very unfavourable for the work with frogs, because the number of frogs in Holland had dropped to an unknown low level. Most frogs had perished during the very long winter. However, we succeeded in capturing enough of them to continue our work.

The rats were Wistar albino rats, bred in the laboratory for many generations. Their food consisted of one part of full milk powder and two parts of ground whole wheat. These rats are mentioned as „normal” rats. Some experiments were performed with rats, confined for some weeks to an aneurin free diet. Their food consisted of ground washed polished rice 83 per cent, casein („Ashless”, from the British Drug Houses) 3 per cent, autoclaved yeast 10 per cent, codliver oil 1 per cent and saltmixture 3 per cent.

The aneurin was dissolved in water immediately before use. It was injected subcutaneously.

The aneurin determinations were carried out by the thiochrome method, the APP determinations by the thiochrome method and by the manometric method (6).

TABLE I.

Normal rats. APP determined in liver by manometric method.

No aneurin injected		Killed 2 hours after the injection of 2 mg of aneurin.	
Rat N°	$\gamma$ APP/g liver	Rat N°	$\gamma$ APP/g liver
1	18	7	32
2	14	8	22
3	19	9	22
4	14	10	18
5	16	11	18
6	12	12	16

Table I shows the APP content of the livers of a series of normal rats, killed two hours after the injection of 2 mg of aneurin, and the corresponding figures obtained simultaneously with similar rats without injection. Though the average of the former series is higher than that of the latter one, the difference is not significant. However, when we also consider the figures of tables II, III and IV we arrive at the conclusion that the APP content of the organs of the rat and especially of the liver can indeed be increased by aneurin injections. Table IV shows that the rise is much less in the kidney than in the liver. Probably this is caused by the high phosphatase content of the kidney which destroys a surplus of APP.

As is shown by comparing tables V, VI and VII, the increase of APP after an aneurin injection is still much more pronounced in the frog.

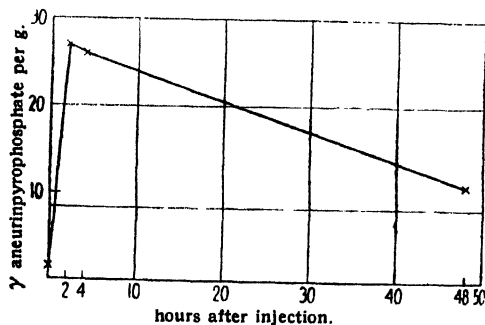


Fig. 2. Average data from table III (rat's liver).

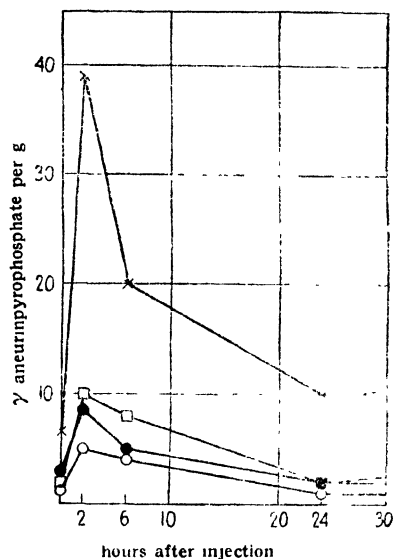


Fig. 1. Average data from table II (rats).

x — x : liver  
 □ — □ : brain  
 ● — ● : muscle  
 ○ — ○ : spleen

The thiochrome method is not so sensitive as the manometric method. For this reason the former is not adequate for the investigation of various small frog's organs in their natural condition. Hence the figures of table V concerning non-injected frogs only prove that the contents of the various tissues are very low. After an aneurin injection, however, also in the case of the frog, it is possible to determine the now much larger amounts of APP by the thiochrome method.

TABLE II.

Normal rats; 10 mg injections; after injection aneurin-rich food *ad lib.* Aneurin- and APP determination by thiochrome method A.

Organ	$\gamma$ per g.														
	No injection			Killed 2 hrs after inject.			Killed 6 hrs after inject.			Killed 24 hrs after inject.			Killed 96 hrs after inject.		
	Rat No.	Aneurin	APP	Rat No.	Aneurin	APP	Rat No.	Aneurin	APP	Rat No.	Aneurin	APP	Rat No.	Aneurin	APP
Liver.....	1	0.5	6	4	30	44	7	2	21	10	1	9	13	0.5	13
	2	0.5	7	5	26	36	8	2	19	11	1	10	14	—	17
	3	0.5	9	6	16	35	9	2	21	12	1	12	15	0.5	10
Muscle .....	1	0.5	1	4	9	8	7	0.5	4	10	1	2	13	0.5	2
	2	0.5	1	5	26	4	8	0.5	2	11	0.5	1	14	0.5	1
	3	1	1	6	3	3	9	0.5	7	12	1	1	15	0.5	1
Brain .....	1	0.5	2	4	0.5	11	7	1	9	10	0	1	13	0	4
	2	0.5	2	5	1	13	8	1	7	11	0	4	14	0.5	1
	3	0.5	3	6	0.5	7	9	—	—	12	1	1	15	0.5	4
Spleen .....	1	1	4	4	4	5	7	0.5	6	10	0.5	0.5	13	1	5
	2	1	3	5	2	10	8	0.5	6	11	0.5	2	14	0.5	6
	3	0.5	1	6	3	11	9	1	4	12	0.5	2	15	2	7

TABLE III.

Rats 4 weeks on aneurin-free diet; sometimes dosed with small amounts of aneurin; 10 mg injections; after injection aneurin-rich diet; APP determinations by manometric method.

	Rat No.	$\gamma$ APP/g liver.
No injection.....	1	1.8
	2	1.5
	3	1.1
Killed 2 hours after injection ..	4	30
	5	29
	6	22
Killed 4 hours after injection ..	7	24
	8	31
	9	22
Killed 48 hours after injection .	10	12
	11	11
	12	10

TABLE IV.

Normal rats, killed 2 hours after the injection of 10 mg of aneurin. APP determined in liver and kidney by manometric method.

Rat No.	$\gamma$ APP/g liver	$\gamma$ APP/g kidney
1	32	17
2	27	15
3	27	15

TABLE V.

Winter-frogs; Dec. 1940. APP- and aneurin determinations in liver and kidney by the thiochrome method.

Treatment of frog	Liver		Kidney	
	$\gamma$ APP/g	$\gamma$ aneurin/g	$\gamma$ APP/g	$\gamma$ aneurin/g
No injection .....	0	1	0	4
	0	0	0	2
	0	0	0	0
	1	1	0	0
	2	1	0	0
Repeatedly injected wit 1.0 or 0.5 mg aneurin. Killed 14 hours after the last injection .....	80	120	52	560
Same, but killed 2½ hours after the last injection .....	104	162	120	1260
	11	60	34	340
	9	65	34	660

TABLE VI.

*R. esculenta*; freshly captured summer- and autumn frogs; no injections; APP determination by manometric method.

Date	Frog No.	Sex	$\gamma$ APP/g					
			Liver	Kidney	Heart	Thigh-muscle	Venter-muscle	Ovarium
July 15th 1940	1	♀	7.0	6.5	4.0	1.7	2.2	2.8
	2	♂	4.5	7.0	7.6	1.2	0.9	—
	3	♂	4.5	5.0	5.3	1.2	1.5	—
	4	♂	2.6	—	8.0	0.8	1.0	—
Sept. 6th 1940	5	♂	7.1	—	—	—	—	—
	6	♂	4.1	—	—	—	—	—
	7	♀	7.2	—	—	—	—	—
Jan. 18th 1941	8	♀	2.5	2.5	4.0	1.3	—	4.0
	9	♀	2.0	2.0	2.5	1.0	—	1.5
	10	♂	3.6	2.5	1.5	1.4	—	—
Febr. 17th 1941	11	♂	3.0	3.0	4.0	0.8	—	—
	12	♀	2.5	3.0	3.0	0.5	—	1.8
	13	♀	2.0	4.5	3.0	0.8	—	0.3

TABLE VII.

Frogs injected subcutaneously with 2 mg of aneurin and killed at different times after the injection.

Date	Time after injection	Frog No.	$\gamma$ /g liver		Method
			APP	Aneurin	
Febr. 22th '40 .....	5 hours	1	66	248	Thiochrome
		2	110	327	"
July 1st '40 .....	2 hours	3	34	76	"
		4	34	84	"
	4 hours	5	28	58	"
		6	28	52	"
		7	48	34	"
	6 hours	8	22	44	"
		9	11	—	Manometric
		10	6	—	"
		11	68	74	Thiochrome

TABLE VII (continued).

Date	Time after injection	Frog No.	$\gamma$ /g liver		Method
			APP	Aneurin	
July 1st '40 .....	18 hours	12	6	—	Manometric
	"	13	6	—	"
	"	14	5	—	"
	"	15	5	—	"
Sept. 3rd '40 .....	2 hours	16	40	—	"
	"	17	50	—	"
	4 hours	18	70	—	"
	"	19	68	—	"
	6 hours	20	42	—	"
	"	21	108	—	"

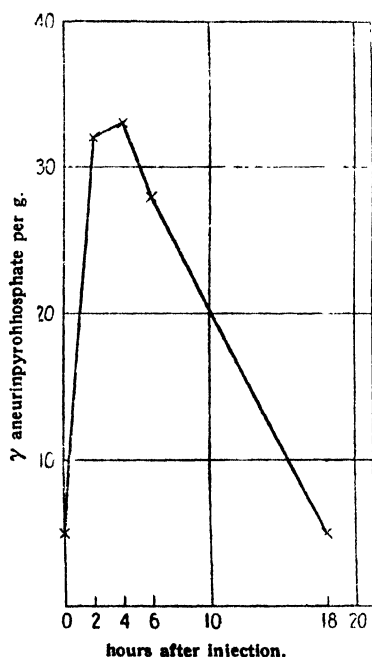


Fig. 3. Average data from table VII (frog's liver), July 1st.

From tables II (fig. 1), III (fig. 2) and VII (fig. 3) it may be seen how rapidly the great surplus of APP declines again. It is interesting to compare these rates with the small difference between the organs of frogs, investigated before and some months after the begin of the hibernation. The experiments with the rats are especially interesting in this respect that these animals were allowed to eat liberally of a food containing abundant aneurin during the elapse of time between the injection and the killing of them. And yet the APP content of their organs decreased rapidly.

Table VI, giving a survey of the APP contents of various frog's organs, shows that no essential difference exists between freshly caught summer- and autumn-frogs and well-fed pigeons and rats. The only difference is that rat's liver, kidney and heart are commonly richer in APP. In view of the results of earlier experiments by WESTENBRINK, VELDMAN, VAN DORP and GRUBER<sup>7)</sup> on the APP contents of different muscles of the pigeon and the rat it is interesting to note that in the case of the frog the APP content of the heart is higher than that of thigh- and venter-muscle, but that no difference appears to exist between both skeleton-muscles.

The experiments on the aneurin excretion through the frog's skin were carried out in the following way: the frogs

TABLE VIII. Frog skin; APP and aneurin determined by thiochrome method.

Frog No.	mg aneurin injected	Killed after	$\gamma$ per g		Remarks
			APP	Aneurin	
1	1	2 hrs	0	8	In water after injection
2	1	2½ hrs	2	18	Dry after injection
3	1	2½ hrs	3	18	" " "
4	0	—	2	0	—
5	0	—	0	0	—
6	0	—	1	0	—

were injected subcutaneously in the back; a piece of skin taken from the venter was examined. It was treated in the same way as the other organs.

When the frogs were kept in water after the injection they were carefully rinsed with tap-water to remove all water in which they had been incubated and which contains all the excreted aneurin.

Table VIII gives the results of the final experiments, showing a distinct aneurin accumulation in the skin.

### Summary.

1. There does not appear to be an essential difference in aneurin metabolism between a warm-blooded animal like the rat and a cold-blooded animal like the frog.

2. The aneurinpyrophosphate content of various organs of frogs in different seasons was determined. The decrease during hibernation is scarcely perceptible.

3. The aneurinpyrophosphate content of rat's and frog's tissues can be raised considerably by the injection of high doses of aneurin. But in the course of one or two days it decreases again to the level observed in individuals provided with abundant aneurin in their food.

4. The behaviour, as outlined sub. 2 and 3, is considered as an indication that in animal tissues aneurinpyrophosphate exists in two forms, the „permanent” form and the „temporary” form.

5. The question whether the native pyruvic acid dehydrogenase is a dissociated enzyme or not is discussed. Most evidence is in favour of a non-dissociated enzyme.

6. When one proposes to compare the aneurinpyrophosphate contents of the corresponding organs of various species the maximal values of the „permanent” APP contents should be compared, which are found about two days after the injection of a high dose of aneurin.

### Zusammenfassung.

1. Es gibt keinen prinzipiellen Unterschied im Aneurinstoffwechsel zwischen einem kaltblütigen Tier, wie dem Frosch, und einem warmblütigen Tier, wie der Ratte.

2. Der Aneurinpyrophosphatgehalt verschiedener Froschorgane wurde in verschiedenen Jahreszeiten bestimmt. Er fällt während des Winterschlafes kaum ab.

3. Der Aneurinpyrophosphatgehalt der Organe beider Tierarten kann durch subkutane Einspritzung sehr hoher Aneurindosen stark gesteigert werden. Im Laufe von ein oder zwei Tagen sinkt dieser hohe Wert jedoch wieder auf das Niveau herab, das bei gut, d.h. mit aneurinreichem Futter ernährten Tieren beobachtet wird.

4. Die unter 2 und 3 genannten Befunde werden als Beweise der Anschauung betrachtet, dass Aneurinpyrophosphat in tierischen Geweben in zwei Formen vorkommt, als „permanentes” und als „temporäres” Aneurinpyrophosphat.

5. Die Frage, ob die native Pyruvodehydrase ein dissoziiertes Enzym ist, wird besprochen und vorläufig verneinend beantwortet.

6. Wenn man beabsichtigt, den Aneurinpyrophosphatgehalt von Organen verschiedener Tierarten zu vergleichen, müssen die Tiere etwa zwei Tage nach der Einspritzung einer hohen Dose Aneurin untersucht werden.

1) S. Ochoa, R. A. Peters, *Biochem. J.* **32**, 1501 (1938). — 1a) H. G. K. Westenbrink, J. Goudsmit, *Enzymol.* **5**, 307 (1938). — 2) F. Lipmann, *Cold Spring Harbor Symposia* **7**, 248 (1939). — 3) F. Lipmann, *Enzymol.* **4**, 65 (1937). — 4) H. G. K. Westenbrink, A. F. Willebrands, Chr. E. Kamminga, *Enzymol.* **9**, 228 (1941). — 5) S. Ochoa, *Biochem. J.* **33**, 1262 (1939). — 6) H. G. K. Westenbrink, J. Goudsmit, H. Veldman, *Vitamine und Hormone*, **1**, 15 (1941). — 7) H. G. K. Westenbrink, H. Veldman, D. A. van Dorp, M. Gruber, *Enzymol.* **9**, 90 (1940).



# Über die Acylase der Mäuseleber

VON

M. YOSHIOKA

(*Utzino-Labor. des Inst. für chem. Forsch. an der Kais. Univ. Kyoto*)

(1.VI.41.)

Seit der Entdeckung des Enzyms durch O. SCHMIEDEBERG<sup>1)</sup> ist die Histozympwirkung in verschiedenen Organen von Rind, Pferd, Schwein, Hund, Kaninchen und Huhn mehrfach untersucht worden (SMORODINZEW<sup>2)</sup>, TAMURA<sup>3)</sup>, UTZINO<sup>4)</sup>, KIMURA<sup>5)</sup> und AKIZUKI<sup>6)</sup>), und besonders in den Verdauungsdrüsen von Schwein, Hund, Kaninchen und Huhn von IMAI<sup>7)</sup>, UTZINO<sup>4)</sup>, KAWAI<sup>8)</sup>, ITZIOKA<sup>9)</sup>. Nach der von E. ABDERHALDEN<sup>10)</sup> vorgeschlagenen Methode haben UTZINO c.s.<sup>11)</sup> über die Verteilung und die Spezifität der Acylasewirkung in den tierischen Organen erfolgreiche Untersuchungen vorgenommen. Unter dem benutzten Material erwies sich die Acylasewirkung der Schweinsniere und -leber im allgemeinen als die stärkste. In Fortführung des Studiums der Acylase der Mäuseleber, auf deren starke Aktivität schon UTZINO und Verf.<sup>12)</sup> hingewiesen hatten, wurden hier vergleichende Versuche mit den Organmacerationen der Katze, der Ratte oder des Meerschweinchens als Material angestellt. Bei der vergleichenden Beobachtung der Acylaseverteilung in verschiedenen Tierarten traten die Benzoyldiglycin- und Benzoylglycinspaltung durch Mäuseleber im gleichen oder in etwas stärkerem Grad als die durch Schweinsleber auf, während eine ähnlich starke Wirkung kaum in Lebermaceration der anderen Tiere festgestellt werden konnte; hier konnte man die Resultate von KIMURA<sup>5)</sup> über Histozym bei den Versuchen mit Organen von Schwein, Hund, Kaninchen und Huhn bestätigen. Nur im langdauernden Digestat zeigte die Lebermaceration der Ratte oder des Huhns einen sehr kleinen Säurezuwachs. Die Wirkung der Mäusenieren erwies sich auch als fast gleich stark wie diejenige der Schweinsniere. Die Nierenmaceration des Meerschweinchens zeigte auch eine starke Aktivität gegenüber diesen beiden Substraten, diejenige der Ratte und des Huhns eine deutliche, aber schwächere. Hier sei auch erwähnt, dass die Nierenmaceration der Katze und des Hundes deutlich Benzoylglycin angriff, doch fast nicht Benzoyldiglycin; in Hundeorganen erwies sich die Niere als das einzige histozymführende Gewebe. Hier wurde weiter darauf aufmerksam gemacht, dass Mäusemilz imstande war, nur Benzoyldiglycin anzugreifen, nicht aber Benzoylglycin, wie dies auch bei Rattenleber der Fall war. Im Hippursäuredigestat durch Hodenmaceration der Maus, des Meerschweinchens und des Hundes wurde ein sehr schwacher Säurezuwachs bemerkt, im Benzoyldiglycindigestat durch Hunde- und Mäusehoden aber nicht. Benzoylglycin und Benzoyldiglycin wurden stärker durch Mäusepankreas als durch Schweins- oder Hundepankreas angegriffen, während Versuche mit Pankreas-maceration der Ratte, Katze, des Meerschweinchens oder des Kaninchens negativ ausfielen. In der Muskel-, Herzmuskel- oder Lungenmaceration der zum Versuch benutzten Tiere wurde die Acylasewirkung vermisst. Nur Mäuse- und Schweinsherzmuskel zeigten eine minimale Aciditätszunahme, welche innerhalb der Fehlergrenze schwankt. Es sei auch noch hervorgehoben, dass man aus dem Digestat mit 0,179 g Benzoylglycin (als Na-Salz) durch Leberpulver (0,8 g) der Mäuse bei pH 7,3 während 72 Stunden 0,075 g Benzoesäure isolieren konnte, die bei 121° C schmolz, während die Isolierung der Substanz aus dem Kontrolldigestat mit Hippursäure mittels erhitzten Leberpulvers negativ ausfiel. Im Hinblick auf die hydrolysierende Wirkung der Maceration von Mäuseleber, -niere oder -pankreas auf Benzoylglycin und Benzoyldiglycin taucht nun infolgedessen eine neue Frage auf, wo die primäre Angriffstelle des Enzyms auf das Benzoylglycylglycin liegt, die aber noch insofern unbeantwortet bleibt, als dem Verf. die Trennung der Acyldipeptidase (Carboxypolypeptidase) oder der Dipeptidacylase vom Histozym noch nicht einwandfrei gelungen ist, obwohl nur die

Histozymwirkung (die Acylase im engeren Sinne) im Eluat aus dem Adsorbat an Tierkohle getrennt von der Benzoyldiglycinspaltung gewonnen werden konnte. Unter Berücksichtigung der  $\text{ph}$ -Werte trat die Benzoyldiglycinspaltung am stärksten bei  $\text{ph}$  7,0 (oder im Bereich von  $\text{ph}$  6,5—8,0) und die Benzoyldiglycinspaltung auch bei  $\text{ph}$  7,0 (oder  $\text{ph}$  7,0—8,0) auf. Hier sei auch ferner erwähnt, dass Benzoyl-*dl*-leucylglycin der Enzymwirkung widerstand, ebenso wie Phthalylglycin, das weder durch Kaninchenleber noch durch Schweinsleber angegriffen wurde. Benzoyl-*dl*- $\beta$ -phenylalanin wurde auch nicht gespalten. Chloracetyl-*l*-phenylalanin wurde deutlich durch Mäuseleber bei  $\text{ph}$  7,5 hydrolysiert, ebenso durch Kaninchen- oder Hühnerleber (ITZIOKA <sup>13</sup> u. <sup>9</sup>), dagegen Chloracetyl-*dl*- $\beta$ -phenylalanin nur wenig. Es wurde auch eine geringe  $\text{NH}_2\text{-N}$  Zunahme im lang dauernden Digestat mit *dl*-Bromisocapronyl-*dl*- $\beta$ -phenylalanin beobachtet. Nach der Angabe von ITZIOKA <sup>13</sup>) war Lebermaceration des Kaninchens oder des Huhns imstande, deutlich *dl*-Bromisocapronylglycin zu spalten, das nur wenig durch Mäuseleber angegriffen werden konnte, die jedoch *dl*-Bromisocaproyldiglycin zu hydrolysieren vermag. Auf Grund dieser Beobachtungen dürfte man wohl darauf hinweisen, dass Bromisocaproylderivate noch widerstandsfähiger als Chloracetyl-derivate sein können, und unter den gleichen Derivaten dasjenige von Diglycin leichter als das von Glycin hydrolysiert werden konnte. Das nicht in der Natur vorkommende  $\beta$ -Phenylalaninderivat war resistenter als das  $\alpha$ -Phenylalaninderivat. Um die Histozymwirkung von der Benzoyldiglycinspaltung zu trennen, hat man Adsorptionsversuche mit Kieselgur, Kaolin und Tonerde ausgeführt, die aber nicht zu befriedigenden Ergebnissen führten, obwohl man Trennungsversuche bei verschiedenen  $\text{ph}$ -Werten gemacht hat. Durch Tierkohle wurden die beiden Wirkungen der Benzoylglycin- und Benzoyldiglycinspaltung adsorbiert, und im Eluat des Adsorbats mittels Ammoniakwassers von  $\text{ph}$  9,0 wurde nur die Benzoylglycinspaltung festgestellt, nicht aber die Benzoyldiglycinspaltung. Nach dieser Beobachtung dürfte man in guter Übereinstimmung mit der Angabe von UTZINO und NAKAYAMA <sup>14</sup>), denen es gelang, die Benzoylglycinspaltung von der Benzoyldiglycinspaltung durch Schweinsniere nach der Adsorptionsmethode zu trennen, wohl von einem Unterschied zwischen diesen beiden Enzymwirkungen sprechen.

### Versuchsteil.

**Enzym.** 1 Teil Organbrei (Schwein, Hund, Kaninchen, Katze, Ratte, Maus und Huhn) wurde mit den 3fachen Volum-Teilen Glycerin-Wasser (1 : 1), das 0,03 % Essigsäure enthält, gut zerrieben, durch ein feines Sieb kolliert und unter Toluolzusatz im Eisschrank aufbewahrt.

**Versuchsansatz:** 0,001 Mol Substrat wurde in 1 cem n-NaOH (Phthalylglycin in 2 cem) aufgenommen und mit Citratpuffer von bestimmtem  $\text{ph}$ -Wert auf 20 cem gebracht, um eine 0,05 molare Substratlosung zu bereiten. Diese Substrat-Pufferlosung hat man unter Zusatz von 2 cem Organmaceration und etwas Toluol bei 37° C digeriert. Nach einer gewissen Zeitdauer hat man die Acidität in 4 cem Digestat nach SÖRENSEN oder den Aminostickstoff in 2 cem nach VAN SLYKE bestimmt.

Zur Kontrolle wurde Enzym-Pufferlosung ohne Substrat unter Toluol der Digestion unterworfen. Die Kontrollwerte hat man von denjenigen der Hauptversuche abgezogen und diese korrigierten Werte als Zunahme der Acidität oder des Aminostickstoffs in Tabellen angegeben.

**Adsorptionsverfahren.** Nachdem die Enzymlosung mit verdünntem Ammoniak und Essigsäure auf das doppelte Volum gebracht worden war, wurde das  $\text{ph}$  auf 4,4, 5,8, 7,2 oder 8,4 eingestellt. Unter Zusatz von Kieselgur (5 %), Tierkohle (5 %), Kaolin (2 %) oder Tonerde (als  $\text{Al}_2\text{O}_3$  0,1 %) wurde die Enzymlosung gut geschüttelt und  $\frac{1}{2}$ —3 Stunden bei Zimmertemperatur (ca. 15° C) stehen gelassen. Das Adsorptionsgemisch wurde in der Zentrifuge abgeschleudert und die obere Flüssigkeitsschicht als Adsorptionsrestlosung auf ihre Acylase-Aktivität geprüft. Der zentrifugierte Rückstand der Adsorption an Tierkohle wurde bei  $\text{ph}$  5,8 mit Ammoniakwasser von  $\text{ph}$  9,0 auf das Anfangsvolumen gebracht, gut geschüttelt (30 Min.) und wieder abzentrifugiert um die Eluataktivität zu bestimmen.

TABELLE I.

Spaltung des Benzoylglycins durch Organmacerationen der verschiedenen Tierarten bei pH 7,3.

Organe	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)							
		Maus	Ratte	Meerschweinchen	Katze	Kaninchen	Huhn	Hund	Schwein
Leber	24	0,43	0	0	0,02	0	0,08	0,05	0,45
	72	1,32	0,08	0,02	0,02	0	0,08	0,05	1,32
	120	1,52	0,17	0,12	0,02	0,08	0,29	0,11	1,35
Niere	24	0,49	0	0,23	0,15	0,07	0,08	0,02	1,00
	72	1,39	0,03	0,54	0,36	0,07	0,18	0,29	1,40
	120	1,67	0,22	0,93	0,43	0,18	0,29	0,49	1,40
Pankreas	24	0,20	0	0	0	0,02	—	0,04	0
	72	0,70	0	0,02	0	0,02	—	0,05	0,10
	120	0,85	0	0,09	0	0,05	—	0,11	0,24
Muskel	24	0,05	0	0	0	0	0	0,05	0
	72	0,05	0	0	0	0	0	0,05	0
	120	0,05	0	0,02	0	0	0	0,17	0
Herz	24	0	0	0	0	0	0,03	0,03	0,07
	72	0,10	0	0	0	0	0,09	0,06	0,12
	120	0,15	0	0	0	0	0,11	0,06	0,27
Lunge	24	0	0	0,03	0	0	0	0	0
	72	0,02	0	0,05	0	0	0	0	0
	120	0,08	0	0,05	0	0	0,05	0	0
Milz	24	0,03	0,03	0	0	0	0,02	0	0,05
	72	0,04	0,05	0	0	0,01	0,05	0,03	0,10
	120	0,04	0,05	0	0	0,02	0,05	0,11	0,17
Hoden	24	0	0	0,05	0,02	0	0	0,03	0
	72	0,17	0	0,10	0,11	0	0,05	0,10	0
	120	0,22	0	0,17	0,12	0	0,08	0,16	0

TABELLE II.

Spaltung des Benzoylglycylglycins durch Organmacerationen der verschiedenen Tierarten bei pH 7,3.

Organe	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)							
		Maus	Ratte	Meerschweinchen	Katze	Kaninchen	Huhn	Hund	Schwein
Leber	24	0,50	0,03	0	0,02	0	0,05	0,08	0,63
	72	1,85	0,17	0,03	0,02	0,06	0,11	0,13	1,62
	120	2,65	0,40	0,10	0,02	0,13	0,18	0,13	2,15
Niere	24	0,49	0	0,59	0	0,05	0,21	0,10	1,70
	72	1,65	0,12	1,31	0,08	0,05	0,30	0,10	1,85
	120	2,42	0,67	1,90	0,16	0,08	0,44	0,13	2,75
Pankreas	24	0,25	0	0	0	0,02	—	0,06	0
	72	0,60	0	0,02	0	0,05	—	0,08	0,17
	120	1,17	0	0,09	0	0,05	—	0,32	0,38

TABELLE II (Fortsetzung).

Organe	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)							
		Maus	Ratte	Mor- schwein- chen	Katze	Kanin- chen	Huhn	Hund	Schwein
Muskel	24	0,05	0	0	0	0	0	0	0,02
	72	0,05	0	0	0	0	0	0,01	0,02
	120	0,05	0	0,02	0	0	0	0,06	0,02
Herz	24	0	0	0	0	0	0,02	0,05	0,09
	72	0,10	0,03	0	0	0	0,03	0,06	0,12
	120	0,15	0,05	0	0	0	0,05	0,06	0,15
Lunge	24	0	0	0,03	0	0	0	0	0
	72	0,04	0	0,05	0	0	0,05	0	0
	120	0,14	0	0,05	0	0	0,07	0	0,02
Milz	24	0,16	0,05	0	0	0	0,06	0	0
	72	0,14	0,05	0	0	0,02	0,05	0,04	0,07
	120	0,24	0,05	0	0	0,02	0,05	0,11	0,07
Hoden	24	0,02	0	0,05	0	0	0	0	0,02
	72	0,03	0	0,10	0	0	0,08	0,01	0,06
	120	0,03	0	0,17	0	0	0,10	0,03	0,06

TABELLE III.

Wirkung der Mauselebermaceration auf Acylaminosäuren und -dipeptide bei verschiedenen pH-Werten.

Substrat	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)							
		pH							
		5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	9,0	
Benzoylglycin. . . . .	24	0	0,33	0,61	0,78	0,58	0,57	0,54	
	72	0,05	1,08	1,40	1,53	1,40	1,36	1,37	
	120	0,04	1,08	1,58	1,65	1,60	1,57	1,34	
Benzoyl-dl-Phenylalanin ( $\beta$ ) . . .	24	—	0	0	0	0	0	0	
	72	—	0	0	0	0	0	—0,03	
	120	—	0	0	0	0	0	—0,03	
Benzoylglycylglycin . . . . .	24	0,20	0,34	0,53	0,75	0,68	0,62	0,62	
	72	0,38	0,63	1,40	1,75	1,45	1,45	1,43	
	120	0,53	1,08	2,05	2,35	2,15	2,10	1,92	
Phtalyldiglycin . . . . .	24	—	0,03	0,04	0,02	0,01	—0,05	0	
	72	—	0,02	0,06	0,05	0,01	0	0	
	120	—	0,11	0,10	0,07	0,01	0,05	—0,09	
Benzoyl-dl-leucylglycin . . . . .	24	—	0	0,04	0,03	—0,08	—0,01	—	
	72	—	0	0,09	0,03	—0,10	—0,01	—	
	120	—	0	0,14	0,03	—0,05	—0,01	—	

TABELLE IV.

Wirkung der Mäuselebermaceration auf Halogenacylaminosäuren und -dipeptid bei verschiedenen ph-Werten.

Substrat	Zeit (Std.)	NH <sub>2</sub> -N Zunahme (mM) in 2 ccm Digestionslösung					
		ph					
		5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
Chloracetyl-l- $\alpha$ -phenylalanin ...	24	—	—	—	—	0,648	—
	72	—	—	—	—	1,163	—
	120	—	—	—	—	1,210	—
Chloracetyl-dl- $\beta$ -phenylalanin ...	24	0,018	0,018	0,066	0,067	0,017	0,016
	72	0,039	0,033	0,030	0,204	0,204	0,164
	120	0,040	0,046	0,034	0,259	0,305	0,180
Bromisocapronylglycin .....	24	0,005	0,005	0,038	0,039	0,033	0
	72	0,006	0,010	0,027	0,024	0,043	0
	120	0,005	0,005	0,048	0,044	0,049	0,016
Bromisocapronyl-dl- $\beta$ -phenylalanin .....	24	—	—	—	—	0	—
	72	—	—	—	—	0	—
	120	—	—	—	—	0,156	—
Bromisocaponyldiglycin. ....	24	—	—	—	—	0,465	—
	72	—	—	—	—	0,746	—
	120	—	—	—	—	0,746	—

TABELLE V.

Wirkung der Adsorptions-Restlösung der Mäuselebermaceration auf Benzoylglycin und -diglycin bei ph 7,3.

Adsorption bei ph	Adsorbens	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestionslösung (ccm 0,1 n-NaOH)					
		24 Std.		72 Std.		120 Std.	
		Benzoyl- glycin	Benzoyl- diglycin	Benzoyl- glycin	Benzoyl- diglycin	Benzoyl- glycin	Benzoyl- diglycin
4,4	Nicht adsorbiert ...	0,25	0,37	0,75	1,32	1,02	2,07
	5 % Kieselgur.....	0,23	0,33	0,68	0,95	1,00	1,68
	5 % Tierkohle.....	0,07	0,35	0,32	1,30	0,57	1,95
	2 % Kaolin.....	0,25	0,33	0,58	0,80	0,75	1,56
	Tonerde (0,1 % Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,25	0,30	0,70	0,75	0,90	1,48
5,8	Nicht adsorbiert....	0,40	0,30	0,90	1,15	1,18	2,00
	5 % Kieselgur.....	0,15	0,23	0,52	0,80	0,74	1,50
	5 % Tierkohle.....	0	0,02	0,03	0,08	0,08	0,10
	2 % Kaolin.....	0,28	0,22	0,77	0,70	0,92	1,42
	Tonerde (0,1 % Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,15	0,12	0,48	0,62	0,63	1,22
7,2	Nicht adsorbiert....	1,00	0,35	1,55	1,55	1,55	2,35
	5 % Kieselgur.....	0,98	0,33	1,53	1,47	1,53	2,15
	5 % Tierkohle.....	0,75	0,30	1,50	1,50	1,55	2,35
	2 % Kaolin.....	0,95	0,30	1,50	1,33	1,50	2,05
	Tonerde (0,1 % Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,95	0,30	1,50	1,40	1,50	2,15
8,4	Nicht adsorbiert....	1,08	0,33	1,45	1,40	1,50	2,10
	5 % Kieselgur.....	0,93	0,30	1,43	1,35	1,48	2,05
	5 % Tierkohle.....	1,00	0,30	1,40	1,40	1,40	2,04
	2 % Kaolin.....	0,95	0,30	1,42	1,30	1,45	2,02
	Tonerde (0,1 % Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,82	0,30	1,40	1,35	1,42	2,05

TABELLE VI.

Trennung der Benzoylglycinspaltung von der Benzoyldiglycinspaltung. Die Tierkohleadsorption wurde bei ph 5,8 unter den gleichen Bedingungen wie in Tabelle V ausgeführt. Eluierung mit Ammoniakwasser von ph 9,0.

Substrat	Zeit (Std.)	Aciditätszunahme in 4 ccm Digestions- lösung (ccm 0,1 n-NaOH), ph 7,3		
		Restlösung	Eluat (ph 9,0)	Nicht adsorbiert
Benzoylglycin ph 7,8	24	0	0,10	0,50
	72	0,03	0,45	1,23
	120	0,03	1,20	1,45
Benzoylglycylglycin ph 7,3	24	0	0	0,37
	72	0,03	0,05	1,33
	120	0,03	0,05	2,02
Glycylglycin ph 7,3	3	0,20	0	0,40
	8	0,30	0,05	0,75
	24	0,70	0,05	1,12
Gelatin (1 %) ph 4,5	24	0,15	0	0,55
	72	0,22	0	0,62
	120	0,30	0	0,70
Casein (1 %) ph 4,5	24	0	—	0,50
	72	0,20	—	0,70
	120	0,45	—	0,90

### Zusammenfassung.

1. In der vorliegenden Arbeit wurde die Enzymverbreitung der Benzoylglycin- und Benzoyldiglycinspaltung in Organen von Schwein, Hund, Kaninchen, Katze, Meerschweinchen, Ratte, Maus und Huhn studiert, und es ergab sich, dass die Wirkung der Mäuseleber und -niere und dieser beiden Schweinsorgane die stärkste war. Hier ist auch besonders hervorzuheben, dass Mäusepankreas unter den anderen geprüften Pankreas-macerationen eine ausgeprägte Aktivität gegenüber diesen beiden Substraten zeigte.

2. Die Mäuselebermaceration vermag Benzoylglycin (bei ph 6,5—8,0) und Benzoyldiglycin (bei ph 7,0—8,0) gleich oder stärker als Schweinsleber anzugreifen, während Benzoyl-*dl*-leucylglycin, Benzoyl-*dl*- $\beta$ -Phenylalanin und Phtalyldiglycin der Wirkung der Mäuseleber widerstanden.

3. Chloracetyl-*l*- $\alpha$ -Phenylalanin (bei ph 7,5) wurde leichter als Chloracetyl-*dl*- $\beta$ -phenylalanin durch Mäuseleber hydrolysiert, ebenso wie *dl*-Bromisocapronyldiglycin; *dl*-Bromisocapronylglycin wurde aber nur wenig angegriffen.

4. An Tierkohle (5 %) bei ph 5,8 wurden die beiden Enzymwirkungen der Benzoylglycin- und Benzoyldiglycinspaltung adsorbiert und in der Restlösung vermisst, in der aber Proteinase (Kathepsin) und Dipeptidase noch erhalten bleiben. Im Eluat mit Ammoniakwasser (ph 9,0) hat man nur die Spaltung des Benzoylglycins festgestellt, aber nicht die des Benzoyldiglycins.

Zum Schluss sei mir gestattet, Herrn Prof. Dr. K. OGIU und Herrn Prof. Dr. S. UTZINO für die gütige Überlassung des Themas und die vielseitige Unterstützung bei der Durchführung dieser Untersuchung meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

1) O. Schmiedeberg, *Arch. für exp. Path.* **14**, 382 (1881). — 2) I. A. Smorodinzew, *Zs. physiol. Chem.* **124**, 123 (1923). — 3) S. Tamura, *Acta Scholae Med. Univ., Kyoto* **6**, 467 (1924). — 4) S. Utzino, *Jl. of Biochem.* **9**, 453, 465, 483 (1928). — 5) H. Kimura, *ibid.* **10**, 207 (1928/29). — 6) H. Akizuki, *ibid.* **25**, 43 (1937). — 7) T. Imai, *Zs. physiol. Chem.* **186**, 205 (1924). — 8) T. Kawai, *Jl. of Biochem.* **10**, 277 (1928/29). — 9) F. Itzioka, *ibid.* **24**, 139, 267 (1936). — 10) E. Abderhalden c.s., *Fermentforsch.* **10**, 748 (1929), **12**, 223 (1931). — 11) S. Utzino c.s., *Jl. of Biochem.* **26**, 439, 449, 477, 483 (1937). — 12) S. Utzino, M. Yoshioka, *Kagaku-Kenkyusho Kooenshuu* **10**, 153 (1939). — 13) F. Itzioka, *ibid.* **7**, 224 (1936). — 14) S. Utzino, M. Nakayama, *Enzymol.* **8**, 280 (1940).

Dem Kultusministerium, das uns durch Gewährung von KAGAKUKENKYU-HI die Durchführung dieser Versuche sehr erleichtert hat, sei an dieser Stelle herzlichst gedankt.

Prof. S. UTZINO.

# The secretion of proteolytic enzymes into the duodenum of the cat after secretin injections

BY

G. ÅGREN

(*Biochem. Dep., Karolinska Inst., Stockholm*).

(5.III.41.)

As previously reported (ÅGREN<sup>1</sup>), the pancreatic juice collected in man after intravenous injections of secretin contains large amounts of carboxypolypeptidase and trypsin. Aminopolypeptidase and dipeptidase were not, it appeared, regularly in evidence. The traces of activity might in some instances have been due to a slight contamination with intestinal juice. It is a well-known fact that glycerol extracts of the pancreas contain large amounts of all three peptidases. On the other hand, after secretin stimulation only carboxypolypeptidase seemed to be regularly secreted from the gland. This might be explained in several ways. The secretion of aminopolypeptidase and dipeptidase in the pancreas may be caused by vagus stimulation or the peptidases from the pancreas may be intracellular enzymes, the dipeptidases and aminopolypeptidases in the digestive juice as collected being secretions from the intestinal glands. The present paper demonstrates one way of secreting aminopolypeptidase and dipeptidase into the duodenum from intestinal glands.

In the very process of finding a method of standardizing secretin it was noted that injections of secretin were followed by a flow of mucous juice from the upper part of the duodenum (ÅGREN and WILANDER<sup>2</sup>). In order to prevent a contamination of the pancreatic juice with the duodenal secretion they were absorbed separately by filter paper. The connection between the injections of secretin and the duodenal secretion and its chemical and enzymatical properties was not subjected to any close examination. In 1934 ÅGREN<sup>3</sup>) showed that injections of crystallized secretin did not stimulate any secretion of proteolytic enzymes from the jejunal and ileal parts of the intestine. Earlier, positive results had been obtained by other authors with impure secretin products. Later NASSET proved that the hormone incretin regulates this secretion. FLOREY and HARDING<sup>4,5</sup>) studied the secretion of juice obtained from duodenal fistulas of animals when starved or given meat. They also tested the effect of MELLANBY's „purified” secretin and recorded a small increase of the volume of the juice secreted from the upper part of the duodenum. The proteolytic enzymes in the juice were not investigated more closely. Experience having confirmed (HAMMARSTEN c.s.<sup>6</sup>)) that MELLANBY's purified secretin was an impure product, the results obtained with this preparation had to be regarded with some caution. ÅGREN and HAMMARSTEN<sup>7</sup>) found that about 10 amino acids could be split off from crystallized secretin without any loss in hormonal activity. The experiment was performed with a trypsin-free aminopolypeptidase prepared from the distal part of the pylorus and the proximal part of the duodenum (ÅGREN<sup>8</sup>)). The great amounts of peptidases found in the pyloric- and duodenal mucosa necessitated a closer investigation of the influence of secretin as a possible stimulant in connection with the secretion of these enzymes into the duodenum.

**Experimental methods.** Cats of about 3 kilogrammes' weight were starved for 24 hours for the purpose of the experiments. The animals were anaesthetized by intramuscular injections of urethane (1.5 g per kg of body weight). The incision in the duodenum took place just above the entry of the bile- and pancreatic ducts, the opening being about 1 cm proximal and distal to *Papilla Vateri*. The common bile duct was ligated and dried filter paper was placed in the distal part of the pylorus in order to preclude any contamination by gastric secretion. The right *Vena saphena* was laid bare and the cat tied up on its right side, thus facilitating the collection of the duodenal secretion by intermittent



suction with a pipette, the pancreatic juice being separately collected by filter paper. The segment of proximal duodenum thus left for collection of juice varied in length between 1 and 2 cm. In some preliminary experiments impure secretin preparations were used. The experiments reported in this paper were performed with secretin chloride prepared from crystallized secretin picrolonate (HAMMARSTEN c.s. 6)). Some preparations made in 1934 (ÅGREN 3)) remained just as active as newly prepared crystallized secretin.

The enzyme determinations of the duodenal juice were carried out immediately. A 30 per cent loss of activity was noted when tests had been left for 24 hours at 0° C. The pancreatic juice was thoroughly extracted from the filter paper by means of water and the solution rapidly concentrated in vacuum at 15° C. to a small volume. In the course of special experiments with different enzyme solutions, prepared from the pancreatic gland and the duodenal mucosa, it was found that the enzymes could be extracted from the filter paper without any loss of activity. The enzyme determinations were made on fractions of juices collected during periods of one hour. The micromethods of LINDERSTRÖM-LANG and HOLTER 9) were used, the substrates being a 0.2 mol. solution of alanyl-glycyl-glycine (ph 7.4) in the determinations of aminopolypeptidase, a 0.2 mol. solution of alanyl-glycine (ph 7.4) in the determinations of dipeptidase, a 0.2 mol. solution of chloracetyl-tyrosin (ph 7.4) and a 4% solution of casein (ph. 7.8) in the determinations of tryptic activity. The bicarbonate determinations were performed by adding an excess of *n*/100 HCl and then titration with *n*/100 NaOH, using the KJELDAHL indicator. The volume of pancreatic juice was calculated from the titration figures, the mean value of the bicarbonate concentration being 100 m. eqv. at maximal stimulation (0.1 mg of secretin every 15 minutes).

### Results.

Usually the duodenal mucosa remained quite dry before secretin injections in spite of observation times lasting as long as 2 hours. After the secretin injections a juice could be collected. This was viscous and could be attenuated into long strings. The fraction collected during the first half hour of stimulation contained some debris as a rule, but the later fractions were clear. 1 per cent acetic acid added to the juice produced a slight haze but no true precipitation followed. Similar results were obtained with 5 per cent acetic acid.

The bicarbonate concentration of the duodenal secretion was not as high as in the pancreatic juice, where it corresponded to the rate of secretion and reached values of about 100 m. eqv. At maximal stimulation the bicarbonate concentration of the duodenal juice varied between 60 and 70 m. eqv. The ph measurements with the glass-electrode yielded values varying between 8.9 and 9.2. Experiments were made with a view to observing whether the appearance of a secretion from the duodenal mucosa after secretin injection coincided with the entry of the pancreatic secretion into the duodenum. It was found that recognisable secretions appeared within 3 minutes from the pancreas as well as from the duodenal mucosa. The variations in reaction times usually ran parallel. The rate of secretion of the duodenal juice was constant on the whole. A typical experiment is given in table I.

TABLE I.  
Rate of duodenal secretion during secretin stimulation.

Time	Amount of secretin injected in mg.	Amount of juice in cc.
0h — 2h	0	0
2h — 3h	4 × 0.1	1.8
3h — 4h	4 × 0.1	2.0
4h — 5h	4 × 0.1	1.9
5h — 6h	0	no collection
6h — 7h	0	0.1
8h — 9h	4 × 0.1	2.0

The total volume of duodenal juice which could be collected, necessarily varied according to the distance between the distal end of the pylorus and the *Papilla Vateri*. The length of this distance determined the size of the surface from which the juice could be collected without any contamination with pancreatic juice. In the cats used this length varied between 1 and 2 cm. Calculated per cm loop of intestine about 1 cc of juice was collected in 1 hour during maximal stimulation. In the same length of time about 6—8 cc of pancreatic juice were obtained.

Enzyme analyses were carried out on duodenal and pancreatic juices collected simultaneously after secretin stimulation. A typical result is given in table II.

TABLE II.

The tryptic and peptidase activities per cmm of duodenal and pancreatic juice determined at 40° and 30 min.

Sample	Volume in cc	Time of collection	Aminopolypeptidase activity in cmm n/20 HCl	Dipeptidase activity in cmm n/20 HCl	Carboxypolypeptidase activity in cmm n/20 HCl	Tryptic activity in cmm n/20 CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
Duodenal juice	2.0	0h — 1h	2.3	0.08	0.006	0
Duodenal juice	2.1	1h — 2h	2.3	0.07	0	0.08
Pancreatic juice	6.9	0h — 1h	0.03	0	0.25	0.95
Pancreatic juice	3.8	1h — 2h	0.04	0	0.07	0.36

### Discussion.

It is obvious that injections of crystalline secretin provoke an abundant secretion of a thick mucoid-like character from the upper part of the duodenum. The volume of juice collected from this part of the intestine usually approaches 1/8—1/6 of the pancreatic juice simultaneously collected. From experiments lasting 5 hours and more it is evident that the rate of the duodenal secretion is rather constant while the pancreatic secretion appears more easily exhaustible. The enzymatical analysis of the proteolytic enzymes in pancreatic- and duodenal juice clearly reveals the different ways in which these enzymes are secreted into the duodenum during stimulation with secretin: carboxypolypeptidase and trypsin with the pancreatic juice, aminopolypeptidase and dipeptidase with the duodenal secretion. The total amounts of aminopolypeptidase and tryptic activity simultaneously secreted into the duodenum during 1 hour of maximal stimulation are of equal size. This fact demonstrates the physiological significance of the secretin effect on the duodenal secretion in the cat. Experimental evidence from fractionated digestion of proteins seems to verify the favourable effects of trypsin and aminopolypeptidase, successively, by splitting off amino acids. An extirpation of a greater part of the proximal duodenal mucosa may in some cases counteract this favourable effect.

The chemical properties of the duodenal juice here recorded also support the view that this secretion may protect the mucosa from damage by the acid gastric juice because of its mucoid-like consistence and fairly strong alkaline reaction. The mucilaginous character of the juice may also explain why peptidases are only traceable in the juice collected in man. The size of the holes in the duodenal tube does not permit a complete suction of this sticky juice. The fact that one of the antipernicious factors is formed in this part of the alimentary canal should be recorded. The possible presence of this particular factor in the duodenal secretion will form the

subject of an investigation. Preliminary experiments seem to show that secretin also stimulates the pyloric mucosa to a secretion with chemical and enzymatical properties similar to those found in the duodenal juice.

### Summary.

Intravenous injections of crystallized secretin stimulate a secretion of an alkaline viscous juice from the upper part of the duodenum. This secretion contains considerable amounts of aminopolypeptidase and also dipeptidase.

### Zusammenfassung.

Intravenöse Injektion von kristallisiertem Sekretin bewirkt die Sekretion eines alkalischen Saftes aus dem oberen Teil des Duodenum. Dieses Sekret enthält erhebliche Mengen von Aminopolypeptidase und auch Dipeptidase.

1) G. Ågren, *Jl. of Phys.* **94**, 553 (1939). — 2) G. Ågren, O. Wilander, *Bioch. Zs.* **250**, 489 (1932). — 3) G. Ågren, *Skand. Arch. Phys.* **69**, 1 (1934). — 4) H. W. Florey, H. E. Harding, *Jl. of Path. Bact.* **39**, 255 (1934). — 5) id. id., *Quart. Jl. Exp. Phys.* **25**, 329 (1935). — 6) E. Hammarsten, G. Ågren, H. Hammarsten, O. Wilander, *Bioch. Zs.* **264**, 275 (1933). — 7) G. Ågren, E. Hammarsten, *Jl. of Phys.* **90**, 930 (1937). — 8) G. Ågren, *Zs. physiol. Chem.* **246**, 280 (1937). — 9) K. Linderstrøm-Lang, H. Holter, *Zs. physiol. Chem.* **214**, 233 (1931); **230**, 9 (1933).

---

# Die zwei Hauptsysteme der Atmung im Warmblütergewebe

VON

F. L. BREUSCH

(*Inst. f. biol. u. med. Chemie der Univ. Istanbul, Türkei*)

Mit 8 Figuren.

(17.III.41.)

Die vorliegende Arbeit behandelt die Frage der Hauptwege des Wasserstofftransports von den Kohlehydraten und ihren anaeroben Umwandlungsprodukten als Wasserstoffdonatoren zu den Cytochromen, resp. zum Sauerstoff in der Atmung der Warmblütergewebe.

Sie ist in folgende Abschnitte verteilt:

1. Die Systeme des Wasserstofftransports vom Coenzym I zum Sauerstoff.
2. Malicodhydrogenase und Reduktion der Oxalessigsäure.
3. Die zwei Hauptsysteme des Wasserstofftransports.
4. Der postmortale Atmungsabfall der einzelnen Gewebe.
5. Die postmortale Inaktivierungskurve der Oxalessigsäurereduktion.
6. Die Steuerung der Atmung durch Calcium.
7. Die Steuerung der Atmung durch Phosphat.
8. Oxalessigsäurereduktion und Citronensäurebildung.
9. Pharmakologie des Systems II.
10. Die Wasserstoffdonatoren der Reduktion der Oxalessigsäure.
11. Diskussion.
12. Die Wechselregel.

## 1. Die Systeme des Wasserstofftransports vom Coenzym I zum Sauerstoff.

Alle Organe der Warmblüter atmen über Succinodhydrogenase (BREUSCH 1937; ELLIOT und GREIG 1937). Alle Organe enthalten das Cytochrom-Cytochromoxydasesystem, wie in den beiden genannten Arbeiten gezeigt wurde. Die bei der Dehydrierung der Bernsteinsäure gebildete Fumarsäure wird durch die Hydroform des gelben Fermentes zu Bernsteinsäure rehydriert (FISCHER und EYSENBACH 1937; LAKI 1937). Das gelbe Ferment übernimmt seinerseits Wasserstoff von der Hydroform des Coenzym I (WARBURG 1936; EULER, ADLER, HELLSTRÖM 1935).

Ein zweiter Weg des Wasserstofftransports führt von Hydrocoenzym I über Diaphorase I und wahrscheinlich über Cytochrom a und b zur Cytochromoxydase und zum Sauerstoff. (Zusammenfassung: DIXON 1939).

Coenzym I (in der Hydroform) ist der Ausgangspunkt für die zwei bis jetzt bekannten hauptsächlichsten Systeme des Wasserstofftransports im Warmblütergewebe. Zur Feststellung des quantitativen Verhältnisses der beiden konkurrierenden Transportwege in den einzelnen Organen habe ich die Malonathemmung der Atmung der einzelnen Gewebe untersucht, da nur der Wasserstofftransport über die Succinodhydrogenase durch Malonat zu etwa 90% gehemmt wird, nicht der über Diaphorase.

In der ersten Tabelle habe ich in der zweiten Rubrik die Atmungshemmung durch m/10 Malonat angegeben; in der dritten Rubrik habe ich die Restatmung in  $\mu\text{l O}_2$  angegeben, die pro Gramm und Stunde nach Abzug der Malonathemmung übrig bleibt. Diese Restatmung

ist in Anbetracht des Umstandes, dass sie als Differenz aus Werten mit bis 25% Streuung errechnet ist, für die meisten Gewebe auffallend konstant; sie liegt etwa um 200  $\mu$ l pro G Feuchtgewebe und Stunde. Diese Restatmung muss zum grossen Teil den Weg vom Hydrocoenzym I über Diaphorase I zur Cytochromoxydase gehen, da diese Restatmung zu 50–80% blausäureempfindlich ist.

Der nicht blausäureempfindliche, quantitativ in der Warmblüteratmung unbedeutende Rest dürfte über o-Chinone vom Hydrocoenzym I direkt zum Sauerstoff führen.

Tatsächlich ist der Diaphorasegehalt der einzelnen Gewebe nach EULER und HASSE (1938) und EULER und GÜNTHER (1938) innerhalb von Variationsgrenzen von etwa 200% für alle Organe derselbe, während der Succinodehydrogenasegehalt der Organe um mehr als 1000% variiert. Wie sich aus dem Vergleich der früheren Arbeiten von BREUSCH (1937) und ELLIOT u. GREIG (1937) mit den Werten der Rubrik II der Tabelle ergibt, laufen die Werte des Succinodehydrogenasegehaltes und der Malonathemmung etwa parallel.

Methodik: 0,2–0,4 g frischer Gewebepulver im WARBURGapparat in 2 ml Ringerphosphat ohne Calcium mit Luft bei 38° geschüttelt; mol/10 neutr. Malonsäure. Hemmung angegeben in % gegen die malonatfreie Kontrolle zwischen der 30sten und 50sten Minute (zur Berücksichtigung der geringen Diffusionsgeschwindigkeit der Malonsäure). Die Malonathemmungen in RINGERbicarbonat sind um etwa 1/3 geringer. Katzenplacenta zeigt bei Wiederholungen manchmal gar keine Malonathemmung.

Organ		Hem- mung	Rest- atmung	Organ		Hem- mung	Rest- atmung
Muskel	Katze .....	80%	260	Lunge	Katze .....	10%	225
Muskel	Taube .....	80%	300	Milz	Katze .....	50%	160
Herz	Katze .....	90%	200	Placenta	Katze .....	45%	190
Magen	Taube .....	90%	90	Hoden Meerschwein ..		60%	210
Niere	Katze .....	85%	210	Embryomuskel	Katze..	80%	90
Leber	Katze .....	70%	400	Embryoleber	Katze..	60%	300
Hirn	Katze .....	20%	800	Embryolunge	Katze..	50%	180
Pancreas	Katze .....	30%	180				

Der Wert dieser Tabelle wird dadurch etwas eingeschränkt, dass nicht nur die Dehydrierung der Bernsteinsäure zu Fumarsäure, sondern auch die Hydrierung der Oxalessigsäure (die der Malonsäure sterisch sehr nahe steht) zu l-Äpfelsäure durch Malonsäure zu etwa 50% gehemmt wird. Die Malonathemmung gibt also quantitativ richtige Werte nur für die Organe, die nicht über das System Oxalessigsäure  $\rightleftharpoons$  l-Äpfelsäure atmen (Lunge, Milz, Hoden, Placenta, Nerven, Tumor- und Embryonalgewebe; BREUSCH 1939). Die Malonathemmung für Muskel, Niere, Leber, Pancreas ist höher als dem wirklichen aktiven Transport über die Succinodehydrogenase entspricht. Die einzige Ausnahme dieser Tabelle ist das Hirn, das eine sehr geringe Atmungshemmung durch Malonat zeigt, also einen geringen Succinodehydrogenasegehalt besitzt, was mit den Ergebnissen von BREUSCH (1937) und von ELLIOT und GREIG (1937) in Einklang steht, die später von BANGA, OCHOA und PETERS (1939) und von GREIG und MUNRO (1939) bestätigt wurden.

Vom Hydrocoenzym I führen 3 Systeme zum Sauerstoff. Das erste ist ein noch nicht genau bekanntes, nicht HCN-empfindliches System; das zweite führt über Diaphorase I zu den Cytochromen a und b und zur Cytochromoxydase. Das dritte System ist der Weg vom Hydrocoenzym I über gelbes Ferment-Bernsteinsäure-Cytochrom c zur Cytochromoxydase. Dieses letzte System ist der eigentliche Träger der Differenzen der Atmungsgrössen der Organe; es zeigt von allen drei Wegen die grösste Variationsbreite und variiert in den einzelnen Organen bis 1000%.

## 2. Malicodehydrogenase und Oxalessigsäurereduktion.

In einer vorhergehenden Arbeit (BREUSCH 1939) konnte ich zeigen, dass der von SZENT-GYÖRGYI c.s. (1935) als ein Hauptweg des Wasserstofftransports von den H<sub>2</sub>-Donatoren zu O<sub>2</sub> aufgezeigte Schritt Oxalessigsäure-l-Äpfelsäure nur in einigen Geweben (Muskel, Leber, Niere,

Pancreas, graue Hirnsubstanz) benützt wird, nicht dagegen im Wasserstofftransport in Lunge, Milz, Placenta, Parotis und Nerven; schon früher war durch SZENT-GYÖRGYI (1938) gezeigt worden, dass auch Tumor- und Embryonalgewebe diesen Schritt nicht benützen.

Da es scheint, dass dieser Unterschied im Wasserstofftransport einer grundsätzlichen Zweiteilung in zwei verschiedenen atmenden Arten von Geweben entspricht, habe ich untersucht, ob der umgekehrte Schritt, die Oxydation der *l*-Äpfelsäure zu Oxallessigsäure, ebenfalls diese Einteilung in zwei Arten von Geweben zeigt, so dass die Gewebe, die Oxallessigsäure zu *l*-Äpfelsäure reduzieren, auch ebensogut *l*-Äpfelsäure zu Oxallessigsäure oxydieren, wie das für die Funktion des  $H_2$ -Transports nötig ist, während die andere Gruppe der die Oxallessigsäure nicht reduzierenden Gewebe auch *l*-Äpfelsäure nicht oder nicht wesentlich oxydiert. Ich habe deshalb die quantitativen Verhältnisse der Malicodehydrogenase und zum Vergleich der Oxalacetatreduktion in den einzelnen Geweben näher untersucht.

Wie erwartet, zeigt es sich, dass alle Gewebe, die unfähig sind, Oxallessigsäure zu reduzieren, auch nur eine sehr schwache Fähigkeit haben, *l*-Äpfelsäure zu oxydieren; jedoch ist eine geringe Menge Malicodehydrogenase in allen Geweben vorhanden, was zeigt, dass die  $C_4$ -Dicarbonsäuren nicht nur als Wasserstofftransportsysteme fungieren, sondern zu einem kleineren Teil auch Durchgangssubstanzen der Verbrennung sind. Eine Ausnahme machen die embryonalen Gewebe, die bei sehr geringer Fähigkeit, Oxallessigsäure zu reduzieren, eine beträchtliche Fähigkeit haben, *l*-Äpfelsäure zu Oxallessigsäure zu oxydieren.

Als **Methodik** des Abfangens der aus *l*-Äpfelsäure gebildeten Oxallessigsäure habe ich nach Vorversuchen über das Optimum der Ausbeute folgende verwendet: Je 4 g frischer, mit der LATAPIEMühle gemahlener Gewebepulver wurde in 6 ml Eiswasser + 10 mg neutralisierter  $As_2O_3$  5 min bei Zimmertemperatur inkubiert, dann 30 mg neutralisierter Fumar-*l*-Äpfelsäure (1 : 3) in 0,6 ml  $H_2O$ , 40 mg Hydrazinchlorhydrat in 2 ml  $H_2O$  und 1 ml einer gesättigten  $NaHCO_3$  Lösung zugegeben und 20 min bei 37° energisch in 100 ml ERLÉNMEYERKOLBchen geschüttelt (aerob). Dann wurde mit Wolframat und Schwefelsäure enteiweißt und nach STRAUB (SZENT-GYÖRGYI u.a. 1935) die gebildete Oxallessigsäure kolorimetrisch bestimmt. Daraus wurde auf die Oxallessigsäuresynthese pro Gramm und Stunde umgerechnet.

Der Arsenzusatz bewirkt in der Atmung aller Gewebe in Bicarbonatlösung eine geringere Hemmung als in Phosphatlösung, da in Phosphatlösung, wie ich im Abschnitt 6 zeige, ein höherer Prozentsatz der Atmung über die Reduktion der Oxallessigsäure läuft als in Bicarbonatlösung. Die  $O_2$ -Aufnahme ist in allen Geweben mit Arsenzusatz 40–60% geringer als in den Bicarbonatkontrollen ohne Arsenzusatz. Fumar-Äpfelsäure erhöht in allen Fällen in den arsenhaltigen Versuchen die Atmung (gemessen 30 min nach Beginn) auf 70–90% der ursprünglichen Kontrollatmung; ein Zeichen, dass die  $H_2$ -Transportsysteme zwischen Malicodehydrogenase und  $O_2$  durch  $As_2O_3$  praktisch nicht wesentlich gehemmt werden.

Für die Bestimmung der maximalen Reduktion der Oxallessigsäure wurden je 5 g Gewebe in 10 ml RINGERphosphat (ohne Calcium) 10 min bei 38° mit 100 mg neutralisierter Oxallessigsäure in 10 ml Wasser inkubiert, die gebildete *l*-Äpfelsäure polarimetrisch bestimmt und als Fumar-*l*-Äpfelsäure auf 1 g und eine Stunde umgerechnet. Ein Überschuss von Oxallessigsäure ist bei dieser Reduktion unschädlich (im Gegensatz zur Oxydation der *l*-Äpfelsäure, die durch Oxallessigsäure gehemmt wird; GREEN und BROSTEAUX 1936).

In der untenstehenden Tabelle zeigt die zweite Reihe die durchschnittliche  $O_2$ -Aufnahme von 1 g Gewebe pro Stunde (Durchschnitt von je 4–5 Versuchstieren im Winter), gemessen im WARBURGapparat an je 0,2–0,4 g Gewebepulver in 2 ml RINGERphosphat ohne Calcium bei 37° zwischen 0 und 20 min. Die angegebene Atmung ist also nicht die Maximalatmung, wie man sie durch Extrapolation der Atmungsabfallkurven auf die Todeszeit erhält, sondern die Atmung, die als Vergleich zur Atmung unter den angewendeten Versuchsbedingungen nötig war.

Die dritte Reihe gibt die Menge der von 1 g Feuchtgewebe pro Stunde reduzierten Fumar-*l*-Äpfelsäure in  $\mu$ l an. Die vierte Reihe gibt an, wieviel % der Atmung des betreffenden Gewebes von dieser Reduktion getragen worden sein kann ( $8 \text{ mg Oxallessigsäure} = 1 \text{ mg } O_2 = 700 \mu\text{l } O_2$ ).

Die fünfte Reihe gibt in  $\mu$ l an, wieviel Oxallessigsäure von 1 g Feuchtgewebe in 1 Stunde aus *l*-Äpfelsäure gebildet wurde; die sechste gibt an, wieviel % der Atmung des betreffenden Gewebes von der Oxydation der *l*-Äpfelsäure getragen worden sein können.

Die gefundenen Werte sind, wenigstens in der 5ten und 6ten Reihe, nicht Maximalwerte, da sie unter unphysiologischen Bedingungen gefunden wurden (Hydrazin,  $As_2O_3$ -Anwesenheit, hypotonische Lösungen zur Sprengung der Zellen zwecks rascher Diffusion). Sie sind trotzdem, obwohl sicher zu niedrig, schon so hoch, dass sie den grössten Teil der Atmung der betreffenden Gewebe zu tragen imstande sind.

Organ	Atmung pro g und Stunde	Oxalessigsäure reduziert zu l- Äpfelsäure	% der Atmung	l-Äpfelsäure oxydiert zu Oxalessigsäure	% der Atmung
Katzenmuskel.....	1300 $\mu$ l	1575 $\mu$ l	100	260 $\mu$ l	20
Taubenmuskel .....	1900 „	2100 „	100	700 „	40
Katzenherz .....	1700 „	1150 „	70	700 „	40
Taubenmagenmus. ....	900 „	1315 „	100	1925 „	100
Katzenniere .....	1450 „	1750 „	100	1575 „	100
Katzenleber .....	2000 „	1315 „	65	1315 „	65
Katzenpancreas .....	600 „	525 „	85	262 „	45
Katzenhirn, gesamt ....	1100 „	175 „	15	350 „	30
Katzenlunge .....	250 $\mu$ l	0	0	70 $\mu$ l	—
Katzenmilz .....	320 „	0	0	53 „	—
Katzenparotis .....	590 „	0	0	35 „	—
Katzennerv periph. ....	280 „	0	0	35 „	—
Katzenplacenta .....	350 „	0	0	70 „	—
Meerschwein-hoden ....	540 „	0	0	106 „	—
Katzenembryomuskel ..	450 $\mu$ l	0	0	525 $\mu$ l	—
Katzenembryoleber ....	750 „	435	60	350 „	45
Katzenembryolunge ....	360 „	0	0	263 „	—

Die in Reihe 4 und 6 gefundenen Werte zeigen, dass praktisch in den Organen, die Oxalessigsäure überhaupt reduzieren, der grösste Teil der Atmung, in einigen sogar die ganze Atmung von dem Wasserstofftransportsystem der reversiblen Umwandlung Oxalessigsäure  $\rightleftharpoons$  l-Äpfelsäure getragen werden kann. Eine Ausnahme macht das Hirn, das eine geringe Reduktion der Oxalessigsäure zeigt. Das kann jedoch auf eine frühe Zerstörung der Coenzyme, wie sie postmortal im Hirn eintritt (JOWETT und QUASTEL 1933), zurückzuführen sein.

Wie sich schon bei der Succinodehydase zeigte, ist ganz allgemein die Atmung des Hirns über das  $C_4$ -Dicarbonsäuresystem geringer als in Muskel, Leber und Niere.

Alle Gewebe, die Oxalessigsäure nicht reduzieren, besitzen auch nur ein zehntel bis ein dreissigstel der Malicodehydrogenase der ersten Gruppe. Embryonalgewebe stehen zwischen beiden Gruppen: sie reduzieren keine Oxalessigsäure, aber oxydieren l-Äpfelsäure fast so stark wie erwachsenes Gewebe. Katzenembryoleber verhält sich wie erwachsenes Gewebe; sie oxydiert l-Äpfelsäure und reduziert Oxalessigsäure.

Beim Vergleich der Atmungsgrössen der beiden Gewebegruppen zeigt sich folgendes: Alle Organe, die Oxalessigsäure reduzieren, haben unter den gewählten Versuchsbedingungen Atmungsgrössen von 1000—2000  $\mu$ l  $O_2$  pro g und Stunde (mit Ausnahme des Pancreas, dessen Atmung als Brei durch autolytische Selbstzerstörung wahrscheinlich vor Beginn der Messung rasch absinkt). Alle Organe, die Oxalessigsäure nicht reduzieren, zeigen Atmungsgrössen von 250 bis 600  $\mu$ l pro g und Stunde, etwa ein viertel der ersten Gruppe.

### 3. Die zwei Hauptsysteme des Wasserstofftransports.

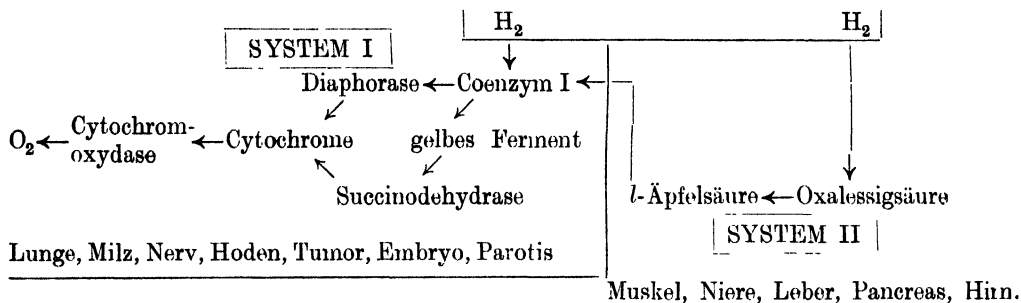
Es gibt unter den Warmblüterorganen (Katze und Taube) zwei Arten von Geweben, die sich in ihrem Atmungsmechanismus grundsätzlich von einander unterscheiden.

Eine Gruppe, Muskel, Niere, Leber, Pancreas, graue Hirnsubstanz, die ihren Wasserstoff grossenteils durch Oxalessigsäure übernehmen und ihn über Malicodehydrogenase an Coenzym I weitergeben, von wo er über die beiden Systeme: 1. gelbes Ferment-Succinodehydase-Cytochrom c und 2. Diaphorase-Cytochrom, zum WARBURG'schen Atmungsferment und zum  $O_2$  transportiert wird. Ein kleinerer Teil des Wasserstoffs der  $H_2$ -Donatoren wird bei diesem

System direkt durch Coenzym I übernommen, da sie auch nach Ausschaltung des Oxalessigsäuresystems noch etwa 10–20% ihrer Maximalatmung (die Hauptatmung BATTELLIS und STERNS) beibehalten.

Eine zweite Gruppe, Lunge, Milz, Hoden, Placenta, Parotis, peripherer Nerv, Tumorgewebe und (teilweise) Embryonalgewebe, übernimmt ihren Wasserstoff nur über Coenzym I und befördert ihn, wie im ersten System, über die beiden Wege Succinodehydase und Diaphorase zum Sauerstoff ohne das System Oxalessigsäure-*l*-Äpfelsäure zu benutzen.

Folgendes Schema zeigt diese Unterschiede:



Ich nenne in der folgenden Arbeit den Wasserstofftransport von Coenzym I zu  $O_2$  System I; den Wasserstofftransport über Oxalessigsäure-*l*-Äpfelsäure zu Coenzym System II.

#### 4. Der Atmungsabfall der einzelnen Gewebe.

Schon von BATTELLI und STERN (1911) ist festgestellt worden, dass alle von ihnen untersuchten Organe als Brei, sowohl in RINGERLösung, als auch in Serum, einen Atmungsabfall zeigen, dass die Atmung aber nach etwa ein bis zwei Stunden in eine zeitlich stabile Ruheatmung übergeht. Sie unterscheiden, ohne Kenntnis der Einzelsysteme, zwei Atmungssysteme, ein hochlabiles, das nach dem Tode rasch inaktiv wird, und ein stabiles, das lange Zeit überlebt.

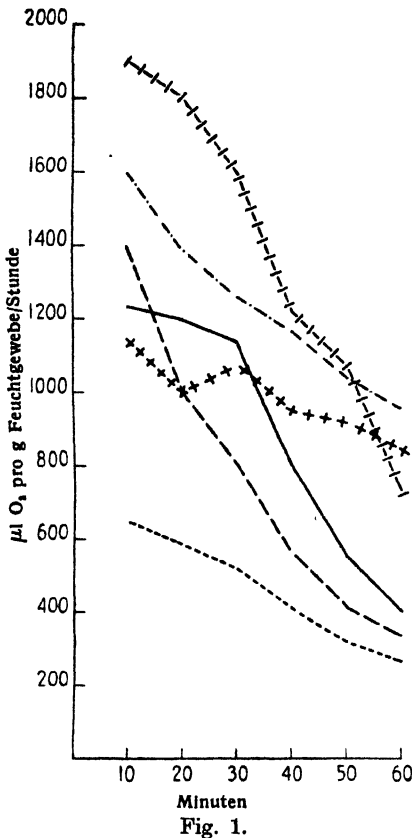
Ich kann diesen Befund erklären. Alle Organe, die neben dem Grundsystem I noch zusätzlich über das System Oxalessigsäure  $\rightleftharpoons$  *l*-Äpfelsäure atmen (System II), zeigen in calciumfreier RINGERphosphatlösung in der ersten Stunde einen raschen Atmungsabfall (Figur 1); alle Organe, die nur über das System I allein atmen, bleiben unter diesen Bedingungen in der ersten Stunde in ihrem Sauerstoffverbrauch konstant (Figur 2).

Der ausgeprägte Unterschied im Atmungsabfall der beiden Systemgruppen (wie aus den Kurvenbildern ersichtlich) ist nur in calciumfreier RINGERLösung so klar, da sowohl Abnahme des Calciums wie Zunahme des Phosphats die Oxalessigsäurereduktion wesentlich fördert (siehe Abschnitt 6 und 7). Die Kurven sind im Winter aufgenommen (Stalltemperaturen von  $-5^{\circ}$  bis  $+10^{\circ}$  C); im Sommer bei Stalltemperaturen von  $20$ – $30^{\circ}$  C sind alle Kurven flacher; ebenso sind in RINGER-Bicarbonat-Glucoselösung nach WARBURG die Kurven flacher; in dieser Lösung zeigen wegen des Glucosezusatzes auch die Organe des Systems I etwas höhere Anfangswerte des Sauerstoffverbrauchs und leicht abfallende Atmungskurven.

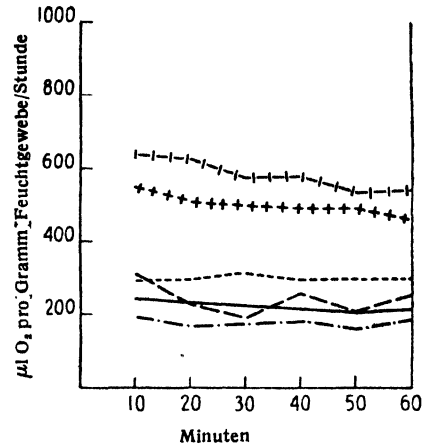
Das schnell zerstörbare Atmungssystem BATTELLIS und STERNS ist identisch mit dem Wasserstofftransportsystem Oxalessigsäure  $\rightleftharpoons$  *l*-Äpfelsäure (System II), von dem ich zeigen konnte (BREUSCH 1939 und Abschnitt 6 dieser Arbeit), dass es nach dem Tode am raschesten, praktisch bereits in einer Stunde, inaktiviert wird. Das konstante Grundatmungssystem ist identisch mit System I.

Methodik: Alle Messungen wurden im WARBURGapparat ausgeführt; je 0,2–0,4 g Gewebepaste, sofort nach dem Tode in der LATAPIEMühle gemahlen, in RINGERphosphat ohne Calcium, 2 ml, Füllung Luft,  $38^{\circ}$ . Alle Angaben in  $\mu$ l  $O_2$ -Verbrauch pro Stunde und g Feuchtgewebe. Als RINGERphosphat wurde (nur) in diesem Fall zur Heraushebung der Gegensätze zwischen den beiden Atmungssystemen eine höhere Phosphatkonzentration verwendet. Die Lösung hatte folgende Zusammensetzung: 100 Teile 0,9% NaCl, 4 Teile 1,15% KCl, 1 Teil 3,8%  $MgSO_4$  und 20 Teile einer





— Katzenmuskel.  
 - - - Taubenmagen.  
 . . . Katzenleber.  
 - · - Katzenhirn.  
 - - - Katzenniere.  
 - | - Taubenmuskel.



— Katzenlunge.  
 - - - Katzenmilz.  
 . . . Meerschweinplacenta.  
 - · - Katzennerf.  
 - | - Katzenparotis.  
 + + + + + Meerschweinhoden.

mit konz. HCl auf Lackmus neutralisierten 10%igen  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  Lösung. Die Lösung war also in Bezug auf Phosphat hypertonisch (siehe Abschnitt 8).

Die in der restlichen Arbeit verwendete RINGER-phosphatlösung entsprach den Zahlen von BANGA und SZENT-GYÖRGYI (1937; Seite 114 unten).

## 5. Die postmortale Inaktivierungskurve der Oxalessigsäurereduktion.

Wie ich schon in einer früheren Arbeit zeigte (BREUSCH 1939; bes. S. 1768) verliert das Enzym, durch das Oxalessigsäure hydriert wird, in der Niere bereits eine Stunde nach dem Tode seine Wirksamkeit fast ganz. Wie man aus der Figur 3 sieht, zeigen

auch alle anderen Organe des Atmungssystems II dieselbe Erscheinung. Muskel, Niere, Leber und Pancreas zeigen praktisch identische postmortale Inaktivierungskurven. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Inaktivierung nicht das Ergebnis eines proteolytischen Zerfalls ist, da der Proteasegehalt verschiedener Organe wesentlich verschieden ist (KREBS 1931).

Die Inaktivierungskurven der Fähigkeit, Oxalessigsäure zu reduzieren, gehen den Atmungsabfallkurven der Organe des Systems I+II parallel. (Siehe die Kurven des Abschnitts 4). Der Atmungsabfall dieser Gewebe ist, wie hiermit wahrscheinlich gemacht ist, der Inaktivierung des Systems II zuzuschreiben. Inaktiviert wird dabei nur das Enzym, das Wasserstoff auf Oxalessigsäure überträgt; nicht das andere am System II beteiligte Enzym, die Malicodhydrogenase, deren Inaktivierung etwa 20 bis 30 mal langsamer verläuft.

Das Enzym, das Wasserstoff auf Oxalessigsäure als Glied des Hauptwegs des Wasserstofftransports überträgt, ist das höchstlabile bisher im Stoffwechsel bekannte; und damit das limitierende Glied aller *in vitro* Versuche über Gewebeatmung.

Alle Versuche, die bisher über Gewebeatmung an Organbrei oder Schnitten später als 30–60 Minuten nach dem Tode des Tieres gemacht sind, erfassen praktisch nur die Reaktionen des Systems I.

Die Inaktivierung ist nicht einer frühzeitigen Erschöpfung des Wasserstoffdonatoren-systems zuzuschreiben, da auch bei gleichzeitigem Zusatz von Hexosediphosphat und von Robisonester (den bisher bekannten hauptsächlichen Wasserstoffdonatoren zur Hydrierung der Oxalessigsäure), die Abfallkurve dieselbe ist.

Die postmortale Abfallkurve der Oxalessigsäurehydrierung ist weder durch Insulin (chemisch rein; Zn-frei), noch durch Adrenalin, Histamin, Thyroxin, Acetylcholin, Coenzym I, Coenzym II, Muskel- und Hefeadenylsäure, Glutathion, Cystein, Vitamin B<sub>1</sub>, Vitamin B<sub>2</sub>, noch durch Kalium, Natrium, Magnesium, auch nicht in hoher Überdosierung zu beeinflussen. Ebenso ist es gleichgültig, ob man das Gewebe anaerob oder unter reinem Sauerstoff schüttelt. Calcium beschleunigt den Abfall (siehe Abschnitt 6); Phosphat erhöht die Reduktionsfähigkeit durch erleichterte Postung der Zuckerphosphorsäuren als H<sub>2</sub>-Donatoren, ohne die Abfallkurve zu ändern (Abschnitt 7). Prinzipiell sind die Abfallkurven dieselben, ob man in RINGERphosphat oder in RINGERbicarbonatlösung arbeitet.

Der postmortale Inaktivierungsabfall der Oxalessigsäurehydrierung erfolgt bei nicht zerkleinertem Muskel, Leber und Nierenstücken beim Aufbewahren bei 37° etwa mit der halben Geschwindigkeit, wie beim Gewebebrei. Die Erhaltung der Hydrierungskapazität der Oxalessigsäure ist also zu wesentlichen Teilen an die Erhaltung der Struktur gebunden, was dieses Enzym nach einer von WARBURG (1914) gefundenen Regel gegen Narkotika und Pharmaka besonders empfindlich macht, so dass hier der spezifische Angriffspunkt einiger Pharmaka liegt, wie ich in Abschnitt 9 zeige. Der Unterschied in den Abfallkurven von Gewebebrei und Gewebeschitten ist der Grund, warum Gewebeschitte im WARBURGapparat länger und gleichmässiger atmen als Gewebebrei.

Methodik: Je 6 g frischer Gewebebrei mit 14 ml RINGERphosphatlösung 3, 30, 60 und 90 Minuten bei 38° aerob geschüttelt, dann 80 mg neutralisierte Oxalessigsäure in 5 ml RINGERlösung ohne Calcium zugegeben, genau 5 Minuten weitergeschüttelt, dann enteiwisst und auf l-Äpfelsäure untersucht. In Kontrollversuchen eine eventuell durch Glykogenhydrolyse entstandene Drehung kompensiert.

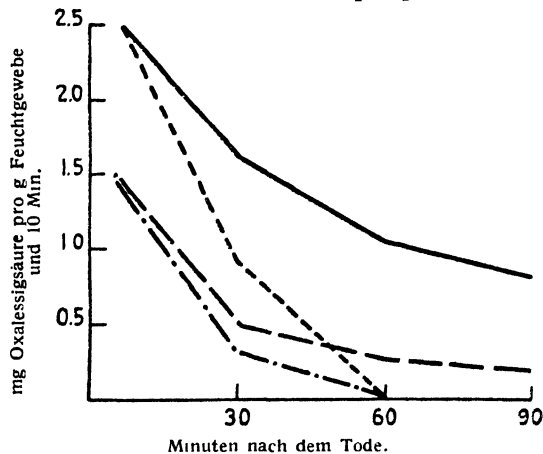


Fig. 3

- Taubenmuskelsstücke.
- - - Taubenmuskelsbrei.
- ... Katzenleberbrei.
- · - · - Katzenleberbrei.

## 6. Die Steuerung der Atmung durch Calcium.

Die Reduktion der Oxalessigsäure durch die Wasserstoffdonatoren des Systems II wird spezifisch durch Calciumionen gehemmt, wie zuerst GREVILLE (1939) qualitativ feststellte. Schon durch die physiologische Konzentration des Serumcalciums (10 mg%, davon etwa 5 mg% ionisiert und dialysabel) wird die Reduktion zu 40% gegenüber der Reduktionsfähigkeit des gleichen Gewebes in calciumfreier RINGERlösung gehemmt. Eine Erhöhung des ionisierten Calciums auf 10 mg% hemmt die Reduktion der Oxalessigsäure und damit das System II zu 80%, während, wie ich später zeige, das System I durch Calcium gar nicht berührt wird.

Bedingungen: 5 g frischer Taubenmuskelbrei + 20 ml RINGERphosphat ohne Calcium + 0, 1, 2, 3 mg Calcium als Calciumchlorid 5 min. aerob bei 37° geschüttelt, dann 80 mg neutralisierte Oxalessigsäure in 5 ml Wasser zugegeben, weitere 5 min. aerob bei 38° geschüttelt, dann enteiwisst und auf l-Äpfelsäure analysiert. In der Rechnung wurde der Calciumgehalt des Muskels selbst vernachlässigt, da er nur ca. 0,2 mg beträgt. Die Fig. 4 gibt den Calciumgehalt in mg% der RINGERlösung.

Praktisch identische Kurven erhalte ich mit Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskel der Katze. In Leber und Niere, die durch Spuren freier Fettsäuren etwas Calcium inaktivieren, sind die Kurven um 2—3 mg% nach oben verschoben.

Dass auch *in vivo* die Steuerung der zusätzlichen Atmung des Systems II durch Calcium erfolgt, lässt sich aus zahlreichen bisher unerklärten Befunden ableiten, die damit ihre Erklärung finden.

THUNBERG (1909) fand als erster, dass die Muskelatmung schon durch physiologische Konzentrationen von Calcium in der normalen RINGERlösung stark gehemmt wird. WARBURG (1910) fand, dass Weglassen von Calcium aus der Nährflüssigkeit die Atmung von Seeigeleiern um 500% erhöht. STARKENSTEIN (1914) fand, dass intravenöse Injektion calciumfällender Substanzen die Körpertemperatur erhöht (durch Erniedrigung des Calciumspiegels im Serum die zusätzliche Atmung des Systems II aktiviert). GORECZKY und v. LUDANY (1938) fanden experimentell, dass nach Injektion von Calciumchlorid, d.h. nach Erhöhung des Serumcalciums von 12,4 mg% auf 13,5 mg%, der O<sub>2</sub>verbrauch um 15% zurückging (also durch Erhöhung des Serumcalciums die zusätzliche Atmung des Systems II herabgedrückt wurde). In zahlreichen Arbeiten (E. FRANK, 1921; SALVESEN, 1928; BEHRENDT, 1924) ist die Ent-

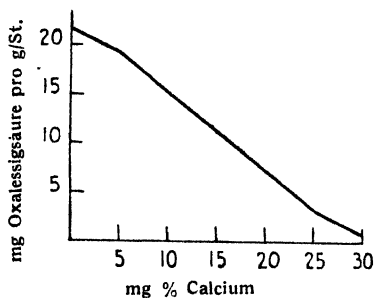


Fig. 4.

deckung von Mc CALLUM und VOEGTLIN (1909) bestätigt, dass bei Tetanie, also Überarbeit des Muskels, der Serumcalciumgehalt vermindert ist (durch Verminderung des Serumcalciums eine Steigerung des Systems II eintritt).

LEICHER (1922) findet bei BASEDOW, ebenso nach Thyreoid-ingaben (also bei abnormaler Erhöhung der Verbrennungen) vermindertes Calcium; bei Myxödem (also bei gegen die Norm vermindertem Stoffwechsel) erhöhtes Serumcalcium. LIPSCHITZ (1936) findet beim Kaninchen nach intravenöser Injektion von 0,2 g/kg Calciumchlorid eine sofortige Hypothermie von 0,5° C.

Der Befund THUNBERGS über die Erniedrigung der Muskelatmung durch Calcium wurde durch MEYERHOF (1919), HOLK (1934), sowie KREBS und EGGLESTON (1938) bestätigt. Die letzteren Autoren fanden, dass im 80 Minuten-Versuch nur Gewebepreparate, nicht Schnitte, den Calciumeffekt zeigen. Ich führe das auf die zu geringe Diffusionsgeschwindigkeit für die dicken Schnitte zurück, für die nur eine ausreichende Diffusionsgeschwindigkeit des Sauerstoffs, nicht aber für grössere Moleküle und Ionen erwiesen ist; *in vivo* bestehen bei den nur 0,001 mm auseinanderliegenden Blutkapillaren ganz andere Diffusionsmöglichkeiten als bei 0,5 mm dicken Schnitten. Wie ich nachher zeige, erfolgt bei den Organen, bei denen die Zellen wegen ihrer langen Form bei der Zerkleinerung in der LATAPIEMühle sicher alle geöffnet werden (Muskeln), der Atmungsabfall nach Zusatz von Calcium viel rascher, als bei den Organen, wie Leber und Niere, deren runde Zellen in der LATAPIE nur zu einem geringen Prozentsatz geöffnet werden. DICKENS und GREVILLE (1935) finden auch an Gehirnschnitten eine Erhöhung der Atmung in calciumfreier RINGERlösung gegenüber calciumhaltiger.

Wenn das Atmungssystem II durch Calcium gesteuert wird, dann muss es möglich sein, in den Organen, die über die Systeme I und II atmen (Muskel, Leber, Niere, Pankreas, Hirn), die Atmung II durch Calciumzusatz spezifisch zu unterdrücken und bei Calciumzusatz, nach einer Diffusionsperiode, die Gesamtatmung auf die ziemlich konstante Grundatmung des Systems I herabzusetzen, wie bei den Organen, die nur nach System I atmen (Lunge, Milz, Hoden, Placenta, Parotis, Tumoren).

Bei den Organen, die nur nach System I atmen, darf der Zusatz von Calcium keine Herabsetzung des Stoffwechsels ergeben.

Bedingungen: Je 0,2—0,4 g frischer Gewebepreparat in RINGERbicarbonat (ohne Ca) und Zugaben entsprechender Mengen Ca als CaCl<sub>2</sub>; Atmung im WARBURGapparat; 38°; Luftfüllung.

Tatsächlich zeigen alle Organe des Systems I + II als Brei schon bei 10 mg % Calcium in der RINGERlösung eine erniedrigte rasch abfallende und dann praktisch konstante Grundatmung (der anfängliche langsame Abfall ist auf die langsame Diffusion des Calciums zurückzuführen). Alle Organe des Systems I + II werden durch Calcium stark gehemmt, ihre Atmung auf System I reduziert; alle Organe des Systems I bleiben durch 15 mg % Calcium in der RINGER-

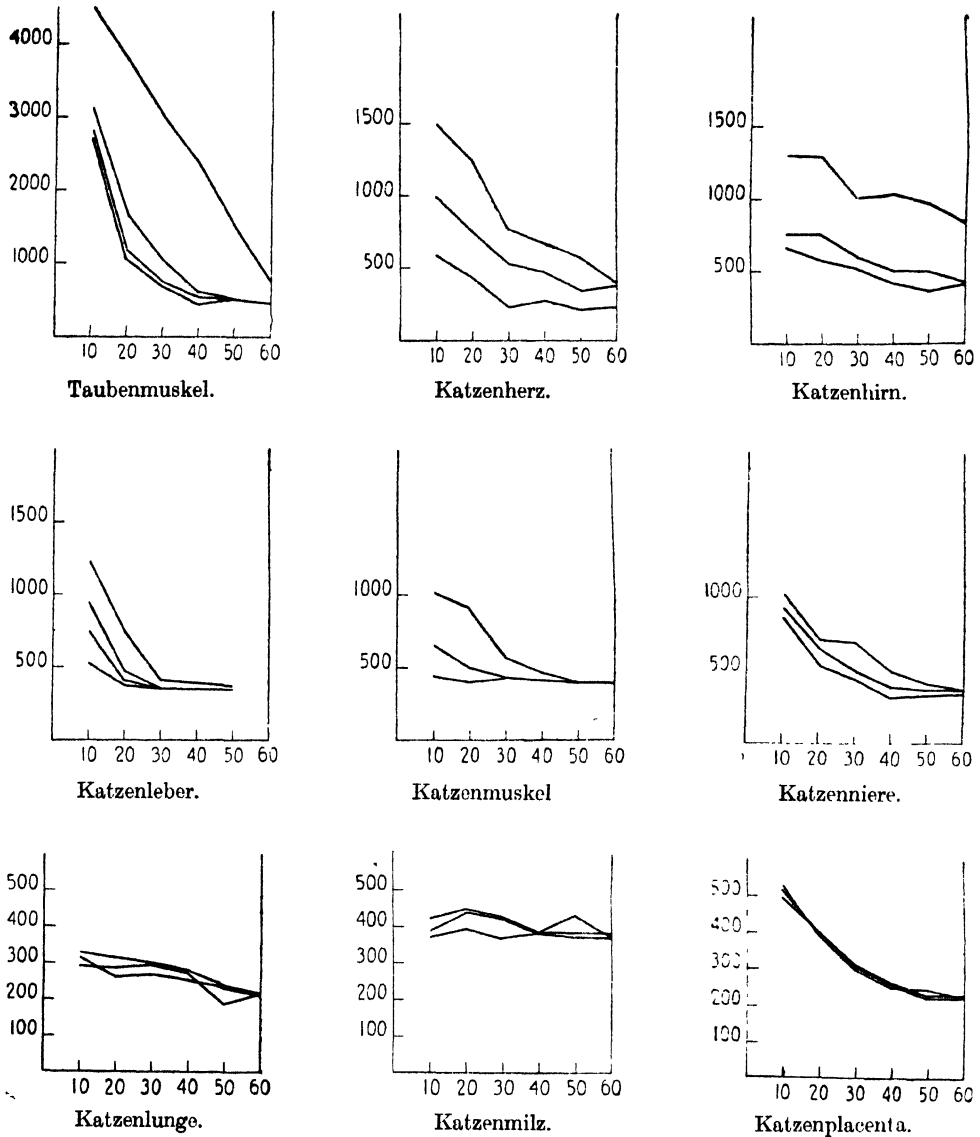


Fig. 5.

Abscisse: Minuten; Ordinaten:  $\mu\text{l O}_2 \text{ pro g Feuchtgewebe/St.}$

Alle Atmungskurven sind in RINGER-Glukoselösung (ohne Calcium) nach WARBURG an frischem Gewebeprei durchgeführt. Die oberste Kurve ist die ohne Calciumzusatz; die darunterliegende ist mit soviel Calcium, als 5 mg % entspricht; die darunterliegende entspricht 10 mg % Ca; die nächste 15 mg % Ca; die nächste 20 mg % Ca.

lösung in ihrem Sauerstoffverbrauch ungeändert gegenüber Kontrollen ohne Calcium. Calcium hat also auf System I in physiologischen Konzentrationen keinen Einfluss; das Calcium beeinflusst selektiv nur System II.

Aus der Grösse der Atmungsdivergenz der Organe des Systems I + II, ihrer Anfangs-

mung ohne Calcium und ihrer Atmung nach einer Stunde mit Calcium (der Grundatmung des Systems I) lässt sich die maximale Atmungsfähigkeit des Systems II in % der Gesamtatmung ungefähr ausdrücken. Die Werte schwanken bei Wiederholungen um 10 bis 15%. Da ich gefunden habe, dass m/500 Phloridzin (neben der Phosphorylierungshemmung der Hexosemonophosphorsäure) selektiv das System II zu etwa 60% hemmt, und zwar sowohl die Oxydation der l-Äpfelsäure wie die Reduktion der Oxalessigsäure, habe in der untenstehenden Tabelle noch die Hemmung der Gewebeatmung der einzelnen Organe in RINGERphosphatlösung ohne Calcium, gemessen im WARBURGapparat, angegeben.

Die erste Zahlenreihe gibt die Atmung pro g Feuchtgewebe und Stunde, aus der Atmungskurve auf die Todeszeit extrapoliert; die zweite Zahlenreihe gibt die Atmung nach einer Stunde in RINGERlösung mit 20 mg % Calcium.

Organ	1	2	Differenz	Atmung des Syst. II	Phloridzin hemmung %
Taubenmuskel .....	5000	500	4500	90%	50 %
Katzenmuskel .....	1250	400	850	70%	60 %
Katzenherz .....	2000	400	1600	80%	60 %
Niere .....	1500	350	1150	80%	70 %
Katzenhirn .....	1600	500	1100	70%	30 %
Katzenmilz .....	400	380	20	—	5 %
Katzenlunge .....	320	220	100	—	10 %
Katzenplacenta .....	640	240	400	—	25 %
Katzenparotis .....	620	600	20	—	5 %
Meerschweinhoden ....	560	360	200	—	10 %

Die Differenz zwischen der Grundatmung und der Maximalatmung beträgt in allen untersuchten Geweben des Systems I + II etwa 70–80%; das heisst, der Organismus ist durch sehr geringe Änderungen des ionisierten Calciums imstande, Atmungssteigerungen bis 400% der betreffenden Organe zu erzielen, genau so wie es WARBURG (1910) zuerst an Seeigeleiern entdeckte. Das gilt nur für den Fall, dass die Reduktion der Oxalessigsäure der limitierende Faktor des Stoffwechsels ist, dass also H<sub>2</sub> Donatoren des Systems II und die nötigen H<sub>2</sub> Acceptoren zum Weitertransport im Überschuss zur Verfügung stehen. Die Phloridzinhemmung ist in diesen Organen von derselben Grössenordnung wie der (roh) errechnete Anteil des Systems II; die Phloridzinhemmung ist etwas niedriger, da Phloridzin das System II nur etwa 60% hemmt.

Ganz anders verhalten sich die Organe des Systems I. Sie zeigen zwischen Zahlenreihen 1 und 2 nur sehr geringe Unterschiede, die zudem nicht durch Calciumhemmung hervorgerufen sind; entsprechend ist die Hemmbarkeit ihrer Atmung durch m/500 Phloridzin meist an der Nachweisgrenze. Da sie (praktisch) nicht durch Phloridzin gehemmt werden (das System II spezifisch vergiftet), ist zusammen mit dem eindeutigen Verhalten der ebenfalls für System II spezifischen Calciumhemmung ein neuer Beweis für die Existenz zweier Atmungsgruppen gegeben.

Da sich die Gesamtatmung und damit die Wärmeproduktion des Körpers durch sehr geringe Verschiebungen des Calciumspiegels stark verändern lassen, vermutete ich, dass der Organismus von dieser Möglichkeit Gebrauch macht, um bei sehr erniedrigter Aussentemperatur (beim Frieren) durch Erniedrigung des Calciumspiegels erhöhte Wärmeproduktion zu erzielen, oder durch Erhöhung des Calciumspiegels bei hoher Aussentemperatur die eigene Wärmeproduktion abzdrosseln. Das ist jedoch nicht der Fall (bei Katzen und Meerschweinchen). Ich habe zu diesem Zweck Katzen und Meerschweinchen nach Kahlrasieren des Felles je 4 Stunden bei 4°, 20° und 38° gehalten und stündlich sowohl das Serumcalcium als auch das dialysable Serumcalcium (nach BaSO<sub>4</sub> fällung des gebundenen) als auch Magnesium und Phosphor des Serums, ausserdem die Reduktionsfähigkeit der Muskeln für Oxalessigsäure untersucht. In allen Fällen, bei mehrfachen Wiederholungen, blieben alle Werte konstant.

	4°	20°	38°
Serumcalcium, gesamt.....	9,8 mg %	9,7 mg %	9,9 mg %
„ „ „, ionisiert .....	3,1	3,8	3,5
Serummagnesium .....	6,0	5,2	6,4
Serumphosphor .....	5,7	5,6	5,9
Aus Oxalessäure gebildete l-Äpfelsäure pro g Muskel und Stunde .....	15 mg	16 mg	15 mg

Das System II hat als Atmungsreservesystem nichts mit der chemischen Wärmeregulation zu tun; weder das Calcium, noch das Magnesium, noch der Phosphor des Serums sind daran beteiligt. Diese Versuche sagen nichts darüber aus, wie weit in den Geweben selbst eine Verschiebung zwischen gebundenem und dialysablem Calcium eintritt. Dass auch im Rahmen des MEYERHOF-EMBDEN-PARNASSCHEN Systems das Calcium eine Rolle spielt, zeigen Versuche von HOLLMANN (1939).

## 7. Beeinflussung der Wasserstofftransportsysteme I und II durch Phosphat.

Phosphationen erhöhen im Skelettmuskel innerhalb der physiologischen Variationsgrenzen die Kapazität des Wasserstofftransportsystems Oxalessäure  $\rightleftharpoons$  l-Äpfelsäure wesentlich. Ich habe deshalb die Phosphatabhängigkeit der Oxalessäurereduktion für alle Organe des Systems I + II untersucht.

Bedingungen: 5 g frischer Organbrei in 15 ml RINGERbicarbonat (ohne Calcium und Phosphat) und steigende Mengen neutrales Natriumphosphat in 2 ml, dazu 80 mg neutralisierte Oxalessäure in 3 ml Ringer 5 Minuten bei 38° aerob geschüttelt, enteiweiss und auf l-Äpfelsäure untersucht. Angaben: Ordinate: mg reduzierte Oxalessäure pro g Feuchtgewicht und Stunde; Abscisse: Phosphatgehalt der RINGERbicarbonatlösung in mg % P.

Die Organe zeigen wesentliche Unterschiede. Im Skelettmuskel erhöht steigendes Phosphat die Oxalessäurereduktion bis zum vierfachen; in Herz und Leber ist eine geringere Erhöhung festzustellen; im Gesamthirn bleibt die (sehr geringe) Reduktion unbeeinflusst und in der Niere vermindert steigendes Phosphat sogar die Oxalessäurereduktion.

Der Grund zu diesem verschiedenen Verhalten liegt in der Verschiedenheit der Phosphorylierungsvorgänge in den verschiedenen Organen, wie ich in einer folgenden Arbeit zeigen werde.

Ebenso wie Phosphat erhöht auch Arsenat die Reduktion der Oxalessäure im Muskel, wenn auch nur etwa 30% äquimolarer Phosphatmengen. Die von MEYERHOF gefundene Atmungserhöhung von Muskelsuspensionen durch Arsenat beruht darauf.

Während Calcium direkt die Reaktion zwischen Oxalessäure und ihren Wasserstoffdonatoren, ebenso wie die Malicdehydrogenase beeinflusst, beeinflusst Phosphat nur indirekt die Reduktion der Oxalessäure durch quantitative Änderungen der Zuckerphosphorylierungen und damit durch Änderung des Angebots an spezifischen Wasserstoffdonatoren.

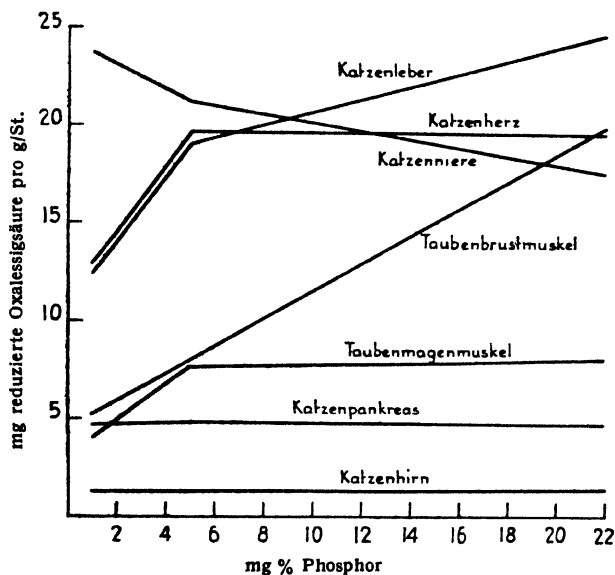


Fig. 6.

Das andere Enzym des Systems II, die Malicodehydrogenase, wird, wie Sonderversuche ergaben, durch Phosphationen nicht merkbar beeinflusst; manchmal ist mit steigendem Phosphat eine 10-20%ige Hemmung festzustellen.

Das System I wird durch Phosphationen ebenfalls nicht beeinflusst, wie spezielle Versuche über die Phosphatbeeinflussung der Menge der durch System I zu Brenztraubensäure oxydierbaren Milchsäure ergaben.

Daraus war zu erwarten, dass auch das System Succinodehydrogenase-Cytochrom C-Cytochromoxydase nicht phosphatsensibel ist. Sonderversuche mit Succinodehydrogenase (Taubenmuskel) ergaben eine geringe Steigerung (10–20%) der dehydrierten Bernsteinsäure bei Steigerung des Phosphats von 0 auf 20 mg % P; bei weiterer Steigerung auf 50 und 200 mg % erfolgt wieder Abnahme um 10%. Gegenüber den Steigerungen der Oxalessigsäurereduktion und der Gesamtatmung um mehrere hundert Prozent spielt diese Variation sicher keine Rolle.

Ich habe weiter die Phosphatbeeinflussung der Gesamtatmung aller Gewebe untersucht.

Alle Gewebe ohne Ausnahme zeigen eine erhebliche Atmungssteigerung durch Steigerung des Phosphats in RINGERbicarbonatlösung. Die Steigerung geht in allen Organen bis zu dem

unphysiologischen hohen Phosphatgehalt von 200 mg % P weiter, noch höhere Konzentrationen erniedrigen die Atmung. Ich habe in der Figur 7 nur die Werte bis 50 mg % P eingezeichnet und die höheren, unphysiologischen Werte weggelassen.

Bedingungen: Je 0,2–0,4 g frischer Gewebestreifen in RINGERbicarbonat (ohne Calcium und Phosphat); Zugabe von P als neutrales Natriumphosphat in 0,5 ml RINGERbicarbonat; Gesamtflüssigkeit 2 ml. Im WARBURGapparat bei 38° unter Luftgeschüttelt. Abszisse: mg % P in der RINGERlösung; Ordinate:  $\mu\text{l O}_2$  Verbrauch pro g Feuchtgewicht und Stunde. Das Eigenphosphat der Organe wurde vernachlässigt.

Von den Atmungssystemen zeigt System I praktisch keine Phosphatabhängigkeit; die Beeinflussung von System II ist nicht gross genug um die ganze Atmungssteigerung durch Phosphat zu erklären. Dadurch wird der vorhin gemachte Schluss, dass Phosphat die Systeme der Wasserstoffbereitstellung fördert, wahrscheinlich. Weiter ist aus diesen Ergebnissen der Schluss berechtigt, dass in allen Organen, sowohl des Systems I wie II, ein Teil des Wasserstoffs über phosphorylierte Zwischenstufen bereitgestellt wird.

Ein geringer Teil der Steigerung der Atmung durch Phosphat in den durch Calcium hemmbaren Organen des Systems I + II ist vielleicht auf eine Inaktivierung des restlichen Gewebecalciums durch Phosphat zurückzuführen.

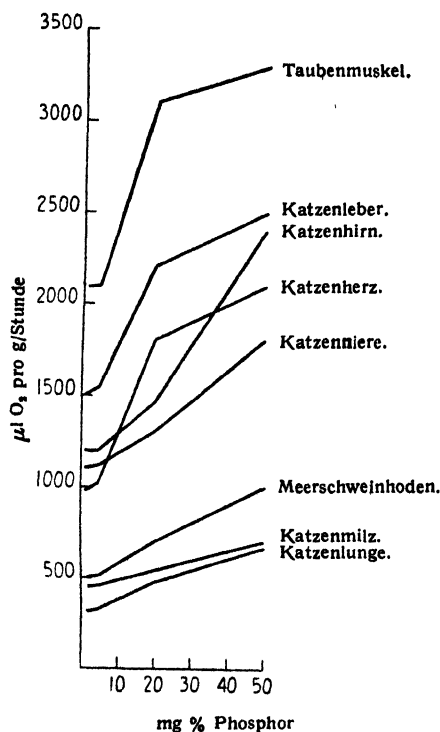


Fig. 7.

## 8. Oxalessigsäurereduktion und Citronensäurebildung.

KREBS (1939, 1940) hat in verschiedenen Veröffentlichungen die Theorie aufgestellt, dass die Reduktion der Oxalessigsäure im Gewebe nicht direkt zu *l*-Äpfelsäure führe, sondern über den Umweg der Bildung von Citronensäure, die über den Umweg nach KNOOP-MARTIUS (1938) Ketoglutaräure-Bernsteinsäure-Fumarsäure in *l*-Äpfelsäure verwandelt wird. Ich habe nachgewiesen, dass das nicht der Hauptweg der Reduktion der Oxalessigsäure ist, und dass die Citronensäure aus Kondensationsprodukten, die bei der Neutralisation der Oxalessigsäure in Wasser entstehen, gebildet wird (BREUSCH 1937). Weiter zeige ich unten, dass die

Zwischensubstanzen des angeblichen Citronensäurecyclus bis 80 mal langsamer vom Gewebe umgesetzt werden als die Reduktion der Oxalessigsäure vor sich geht.

KREBS wendet bei seinen Versuchen calciumhaltige RINGERbicarbonatlösung an, ich calciumfreie Ringerphosphatlösung. Ich untersuchte deshalb, ob der Calciumgehalt der Lösungen in physiologischen Grenzen einen Einfluss auf die Citronensäurebildung hat, da sich gezeigt hatte, dass die Reduktion der Oxalessigsäure durch steigendes Calcium wesentlich gehemmt wird.

Tatsächlich zeigt sich ein solcher Einfluss. Mit steigendem Calcium steigt bei Bebrütung von Muskelbrei mit überschüssiger neutralisierter Oxalessigsäure die Menge der gebildeten Citronensäure, während gleichzeitig die Menge der aus Oxalessigsäure gebildeten *l*-Äpfelsäure abnimmt.

Bedingungen: g frischer Katzenmuskelbrei in 13 ml RINGERbicarbonatlösung (ohne Ca, ohne P) + 100 mg in 8 ml RINGER (ohne Ca, P) neutralisierter Oxalessigsäure + steigende Mengen  $\text{CaCl}_2$  in 2 ml dest. Wasser je 20 min. aerob bei 38° in 250 ml ERLÉNMEYERKölbchen geschüttelt. Fig. 8: Abscisse: mg % Ca; Ordinate: gebildete mg *l*-Äpfelsäure, resp. Citronensäure.

Die Kurve scheint einen Mechanismus des Organismus zur Konstanthaltung des Gehaltes an löslichem Calcium des Organismus aufzuzeigen, so, dass mit steigendem Calcium steigende Mengen Citronensäure gebildet werden, die den Überschuss des Calciums fällen, bis die Konzentration des Calciums unter die Löslichkeit des Calciumcitrats sinkt.

Das würde auch den KREBS'schen Citronensäurecyclus, dessen Existenz für den Muskel ich angezweifelt habe, sicherstellen, wenn nicht die erstaunliche Tatsache wäre, dass schon durch Schütteln neutraler Oxalessigsäurelösungen mit Calcium<sup>++</sup> bei 38° (auch schon bei Zimmertemperatur, ebenso mit Strontium und Barium) in RINGERbicarbonatlösung, ohne jedes Gewebe, grosse Mengen Kondensationsprodukte entstehen, die die Reaktion auf Pentabromaceton geben, also in jede bisher bekannte Nachweismethode für Citronensäure als solche eingehen. Natrium, Kalium und Magnesium sind unwirksam.

Bedingungen: Je 20 ml RINGERbicarbonat resp. RINGERphosphat ohne Ca + 200 mg einer in 20 ml dest. Wasser neutralisierten Lösung von Oxalessigsäure + steigende Mengen  $\text{CaCl}_2$  20 min aerob bei 38° geschüttelt, dann auf Citronensäure analysiert (Verfahren wie BREUSCH 1939).

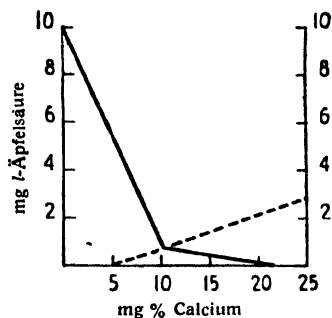


Fig. 8.

— Äpfelsäure.  
- - - Citronensäure.

mg % Calcium	RINGERphosphat	RINGERbicarbonat
0	0 mg Citronens.	0 mg Citronens.
50	1 mg „	5 mg „
150	15 mg „	20 mg „

Den Einfluss der Zeit auf die Bildung des Kondensationsproduktes zeigt folgende Tabelle: Bedingungen: wie oben, RINGERbicarbonat, 100 mg % Ca.

1. sofort analysiert	0 mg Citronensäure
2. 20 Min bei 38°	15 mg „
3. 60 Min bei 38°	25 mg „

Die obere Tabelle zeigt, dass die Menge der gebildeten Citronensäure deutlich von der Konzentration des Calciums abhängt; in Phosphatlösung, die mehr Calcium inaktiviert als Bicarbonatlösung, ist die Kondensation geringer. Die untere Tabelle zeigt, dass die Kondensation auf Grund einer langsamen Katalyse durch Calciumionen in neutraler Lösung erfolgt. Ohne Calcium kann man neutrale Oxalessigsäurelösungen beliebig lang in RINGERbicarbonat schütteln, ohne dass Kondensation eintritt. Ebenso wenig wird in verdünnter (1%) saurer oder alkalischer Lösung, auch bei Anwesenheit von Calcium, ein Kondensationsprodukt gebildet.

Die erstaunliche Bildung eines Kondensationsproduktes aus Oxalessigsäure,



das Pentabromacetonreaktion gibt, zusammen mit meinem früheren Befund, dass schon bei der Neutralisation der Oxalessigsäure in konzentrierten Lösungen Citronensäure entsteht, zeigt erneut, wie vorsichtig man mit der Deutung aller Kondensationsreaktionen der Oxalessigsäure sein muss, da gerade die Kondensationsreaktionen der Oxalessigsäure, deren Existenz in den Geweben erst bewiesen werden soll, in den bei Gewebeversuchen immer angewendeten unphysiologisch hohen Konzentrationen an Oxalessigsäure meistens rein chemische schon vorher und unerwartet abgelaufene Reaktionen sind. Im Gegensatz dazu ist die Umwandlung der Oxalessigsäure in *l*-Äpfelsäure eine ausschliesslich enzymatische Reaktion; irgend eine rein chemische Umwandlung in neutraler Lösung ist bis jetzt nicht bekannt.

Ich habe (1939) gezeigt, dass in der Niere (nicht aber in irgend einer Art von Muskel), wo neben der Reduktion der Oxalessigsäure zu *l*-Äpfelsäure auch Kondensation von Oxalessigsäure mit Brenztraubensäure zu Citronensäure stattfindet, angenähert physiologische Konzentrationen von Oxalessigsäure (unter 20 mg %) praktisch quantitativ in *l*-Äpfelsäure übergehen, während Citronensäure erst aus unphysiologisch hohen Oxalessigsäurekonzentrationen als Überschussreaktion gebildet wird. Selbst in der Niere (erst recht im Muskel) ist also die Reduktion der Oxalessigsäure primäre Hauptreaktion, und der Cyclus eine sekundäre Überschussreaktion.

Ich glaube, dass alle bisher beigebrachten Beweise für die Cyclustheorie unreal sind, weil die gefundene Citronensäure ein **Kunstprodukt** ist, das bei der Neutralisation der Oxalessigsäure oder durch Calciumkatalyse beim Bebrüten der unphysiologisch hohen Konzentrationen gebildet wurde.

Ich kann jetzt zwei, wie ich glaube, endgültige Beweise erbringen, dass der Citronensäurecyclus als Mechanismus der Muskelatmung keine Realität hat.

I. Ich habe die Geschwindigkeit untersucht, mit der die einzelnen Glieder des hypothetischen Cyclussystems im Muskelbrei in *l*-Äpfelsäure umgewandelt werden. Wenn, wie KREBS behauptet, ein grosser Teil der Umwandlung der Oxalessigsäure in *l*-Äpfelsäure über den Cyclus geht, dann muss die Umsatzgeschwindigkeit der Kettenglieder mindestens gleich oder grösser sein als die Geschwindigkeit des Umsatzes zwischen den Kettengliedern.

Je 10 g Taubenmuskelbrei (2 Min. nach dem Tode) + 15 ml RINGERphosphat (ohne Calcium) + 1 Millimol der betreffenden neutralisierten Säure aerob bei 38° 5 Min geschüttelt, dann enteiweiss und auf *l*-Äpfelsäure untersucht.

Zusatz von 1 Millimol	Ausbeute Fumar.- <i>l</i> -Äpfelsäure in Millimol
Oxalessigsäure	0,81
Citronensäure	0,02
$\alpha$ -Ketoglutar säure	0,04
Bernsteinsäure	0,20

Keine einzige der Zwischenreaktionen des hypothetischen Cyclus hat die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen den Endgliedern Oxalessigsäure-*l*-Äpfelsäure. Die Umsatzgeschwindigkeit der Citronensäure beträgt unter denselben Bedingungen nur 2% des Hauptumsatzes. Als Citronensäure-Isocitronensäuregemisch konnte ich 98%, das heisst praktisch alles nach der Reaktion wiederfinden. Das ist ein strenger Beweis, dass mindestens 98% der Reduktion der Oxalessigsäure zu *l*-Äpfelsäure nicht über den Cyclus gegangen sein kann.

II. Die Umwandlung Oxalessigsäure-*l*-Äpfelsäure erfolgt mit praktisch derselben Geschwindigkeit auch anaerob. Das ist nur bei Annahme direkter Reduktion möglich, da bei der Umwandlung von 0,8 Millimol Oxalessigsäure in 0,8 Millimol *l*-Äpfelsäure nach der KREBS'schen Formulierung  $\text{Oxalessigsäure} + \text{Brenztraubensäure} + 2 \text{O}_2 = 3 \text{CO}_2 + \text{l-Äpfels.} + \text{Wasser}$ ,  $0,8 \times 2 = 1,6 \text{ Millimol O}_2 = 85,8 \text{ Milliliter O}_2$  von Normalbedingungen nötig wären.

Die Versuchsbedingungen waren folgende: 10 g Taubenbrustmuskel + 10 ml RINGERphosphat

ohne Calcium 3 Min. in einem Gefäß von 75 ml Inhalt auf 2 mm Hg evakuiert (Leistung der Motorpumpe), dann im Vakuum 1 Millimol neutralisierte Oxalessigsäure in 5 ml Wasser zugegeben, 5 min bei 38° bebrütet, enteiwesst und l-Äpfelsäure bestimmt.

Das Gefäß enthielt nach dem Evakuieren noch 0,2 ml Luft = 0,04 ml O<sub>2</sub>; dazu kann man bei Annahme von maximal etwa 2% Myo- und Hämoglobingehalt der 10 g Muskel und einem O<sub>2</sub>-Äquivalent von etwa 17.000 etwa 0,3 ml an gebundenem O<sub>2</sub> rechnen. Insgesamt 0,34 ml = 0,015 Millimol O<sub>2</sub>.

Die Umsetzung im Vakuum ergab aus 1 Millimol Oxalessigsäure 0,8 Millimol Fumar-l-Äpfelsäure. Wenn die Cyclustheorie richtig wäre, hätten dazu 1,6 Millimol = 85,8 Milliliter O<sub>2</sub> verbraucht werden müssen; in Wirklichkeit waren nur 0,015 Millimol = 0,34 Milliliter O<sub>2</sub> im ganzen Reaktionssystem vorhanden. Das beweist eindeutig und wohl endgültig, dass die Umwandlung Oxalessigsäure-l-Äpfelsäure höchstens zu weniger als 2% über den angenommenen Cyclus gegangen sein kann.

### 9. Pharmakologie des Systems II.

Ich habe in der folgenden Tabelle die Hemmungen der beiden Hauptenzyme des Systems II, der Malicodehydrogenase und des Enzyms der Reduktion der Oxalessigsäure durch verschiedene Zusätze zu den Versuchsanordnungen des Abschnitts 5 ermittelt; daneben die Hemmungen des Systems I.

Hemmungssubstanz		System II		System I	
		Reduktion der Oxal- essigsäure	Oxydation der l- Äpfelsäure	Succino- dehydro- genase	Lactico- dehydro- genase
NaF	100 mg% . . . . .	30%	0%	0%	0%
Ca	20 „ . . . . .	80	95	0	20
Mg	60 „ . . . . .	30	0	0	0
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	200 „ . . . . .	100	0	0	0
As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	200 „ . . . . .	0	0	0	0
Selenat	100 „ . . . . .	100	0	0	0
Wolframat	500 „ . . . . .	0	0	0	0
Digitalin	500 „ . . . . .	45	45	0	0
Salicylat	500 „ . . . . .	100	40	0	0
Chininsulfat	200 „ . . . . .	80	40	0	0
Avertin (Tribromaethanol)	200 mg	60	60	40	30
Aether, Totalsättigung	„ . . . . .	33	40	50	20
Chloroform	„ . . . . .	100	100	—	100
Chloralhydrat	200 mg% . . . . .	60	40	40	0
Aethanol	7,5% . . . . .	60	50	40	40
Propanol	3 % . . . . .	70	70	50	30
n-Butanol	2 % . . . . .	80	100	—	20
Amylalk. (Gärungs)	1,2% . . . . .	70	100	40	50
Octylalkohol, Sättigung	„ . . . . .	80	100	20	50
Toluol, Sättigung	„ . . . . .	—	100	—	60
Thymol, „	„ . . . . .	—	100	—	80

Folgende Substanzen sind ohne jede Einwirkung auf die vier genannten Enzyme: Je 200 mg % Veronal, Pyramidon, Sulfonal, Tetronal, Novocain, Narcein, Nicotin, Pilocarpin, Aconitin, Strychnin, Paraldehyd, Coffein, Morphin, Heroin, Antipyrin; ebenso je 30 mg % Histamin, Acetylcholin und Eserin, Adenosin, Hefe- und Muskeladenylsäure, Adrenalin, Thyroxin, Betaxin, kristallisiertes zinkfreies Insulin, Glutathion, Cystein und Cystin, Ascorbinsäure, ebenso wie Dioxymaleinsäure hemmt die Reduktion der Oxalessigsäure bei 50–100 mg% manchmal um etwa 30%.

Alle oben angegebenen Werte variieren stark mit Änderungen der Salzkonzentrationen, was auf eine wesentliche Beteiligung kolloidphysikalischer Einflüsse hindeutet. Bei allen Variationen der Einzelwerte wird trotzdem immer das System II stärker geschädigt als das System I.

Die Enzyme des Systems II sind also gegen Pharmaka und Atmungsgifte wesentlich empfindlicher als alle Enzyme des Systems I, da die Nichtempfindlichkeit des letzten Kettenproduktes des Systems I, der Lacticodehydrogenase, automatisch auch die relative Unempfindlichkeit der anderen Enzyme bis zur Cytochromoxydase mit einschliessen muss.

Die erhöhte Empfindlichkeit der Malicodehydrogenase und des für die Reduktion der Oxalessigsäure verantwortlichen Enzyms, gegenüber der Lacticodehydrogenase dürfte daran liegen, dass die Lacticodehydrogenase leichter aus Gewebe extrahierbar, also nicht so fest an die Gewebestruktur gebunden ist, wie die Enzyme des Systems II. Nach einer von WARBURG (1914) gefundenen Regel sind strukturgebundene Katalysatoren gegen Narkotika empfindlicher als gelöste. Ich mache deshalb die, vorläufig unbewiesene, Annahme, dass die Enzyme des Systems I (ausser der von der Struktur nicht abtrennbaren Cytochromoxydase) im Zellinhalt teilweise in Lösung vorliegen, während die Enzyme des Systems II fester an die Zellstruktur gebunden sind.

Bei der Durchsicht der Tabelle fällt auf, dass nur einige peripher wirkende Antipyretika, weiter alle Narkotika, ausserdem Digitalin diese Erscheinung der primären spezifischen Schädigung des Systems II zeigen, dass dagegen kein einziges der pharmakologisch wichtigen Alkaloide selbst in tausendfach überhöhter Dosis einen Einfluss hat. Dem Mechanismus der Narkose, für die nach diesen Versuchen keine der bestehenden Theorien allein eine Erklärung zu geben vermag (Literatur siehe WINTERSTEIN 1926), und dem Wirkungsmechanismus der Antipyretika, soweit sie nicht nur auf das Wärmезentrum wirken, liegt also derselbe periphere chemische Mechanismus zugrunde, die spezifische Herabsetzung der Atmung durch Hemmung des Systems II!

Was ein Narkotikum, was ein Antipyretikum oder Analgeticum ist, wird anscheinend von sekundären Faktoren, der chemischen Affinität zu bestimmten Organbestandteilen oder Gehirnbezirken oder spezifischen Durchlässigkeiten bestimmter Organgefässe entschieden. Ich betone noch, dass die für die Atmungshemmung in den vorliegenden Versuchen angewendeten Dosen bis zum 100 fachen grösser sind als die maximalen therapeutischen Dosen am ganzen Organismus.

Dieses Kapitel soll nur einen Hinweis auf Lösungsmöglichkeiten von bisher in ihrem Mechanismus ganz unbekannten pharmakologischen Erscheinungen geben, ohne zu einer Theorie Stellung zu nehmen.

## 10. Die $H_2$ -Donatoren der Reduktion der Oxalessigsäure.

Die  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion wurden zum ersten Mal von BANGA und SZENT-GYÖRGYI (1987) untersucht. Da jedes normale Gewebe mit  $H_2$ -donatoren soweit gesättigt ist, dass Zusatz beliebiger Stoffe in keinem Fall die Bildung der *l*-Äpfelsäure erhöht, musste das Enzym, das Oxalessigsäure zu *l*-Äpfelsäure hydriert, isoliert werden.

Gerade dieses Enzym ist aber, wie ich in Abschnitt 5 zeigte, das höchstempfindliche am Stoffwechsel beteiligte (soweit bisher bekannt). BANGA gelang es, dieses Enzym in geringer Ausbeute bei Arbeiten in Eis für 1 bis 2 Tage haltbar zu isolieren. Sie konnte damit feststellen, dass Fructose-1-6-diphosphorsäure und Glucose-6-phosphorsäure  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion sind. Da beide Stoffe über den MEYERHOF-EMBDEN-PARNASSCHEN Abbauweg sehr rasche Umwandlungen im Gewebe durchmachen, war es unsicher, ob wirklich die beiden angegebenen Stoffe, oder deren sekundäre Umwandlungsprodukte die  $H_2$ -Donatoren waren.

Ich habe (1989) ein anderes Verfahren zur Isolierung des Enzyms ausgearbeitet, das jedoch auch zu keinem dauerhafteren Präparat führte. Für Serienversuche waren beide Verfahren unbrauchbar.

Ich habe deshalb zur Feststellung der  $H_2$ -Donatoren der Atmung ein anderes Verfahren für Serienbestimmungen ausgearbeitet, um eindeutig feststellen zu können, welche Substanzen  $H_2$ -Donatoren sind und welche nicht.

Es besteht darin, dass die Gewebe der zu den Versuchen verwendeten Tiere durch Hungernlassen an  $H_2$ -Donatoren künstlich verarmt werden; der Rest lässt sich bei Muskeln durch Arbeitenlassen an der Tretbahn entfernen; aus den Lebern lässt sich der Rest durch Adrenalin wegbringen. Die Verfahren sind mit vieler Mühe (und nach vielen Fehlschlägen) ausgearbeitet; sie müssen bei Wiederholungen peinlich eingehalten werden. Verwendet wurden nur Katzen, die hier zahlreich herrenlos herumlaufen, während Kaninchen sehr teuer sind.

**Verfahren:** Magere Katzen (keine fetten Hauskatzen) von 1400—2000 g Gewicht werden 6 Tage bei beliebiger Wasserezufuhr in Käfigen im Freien hungern gelassen.

Um die Katzen dann für einen Leberversuch vorzubereiten, erhalten sie am 7ten, 8ten, 9ten und 10ten Tag morgens und abends je 1,5 mg kristallisiertes Adrenalin in 1 cc RINGERLÖSUNG subcutan (bei weitergehendem Hunger). Die Lebern sind für den Versuch erst dann brauchbar, wenn die Tiere so schwach sind, dass sie freiwillig auf der Seite liegen bleiben. Bei grossen Katzen kann man die Adrenalindosis auf täglich  $2 \times 2$  mg Adrenalin steigern. Die letzten beiden Tage hält man die Tiere zweckmässig nicht in Ställen im Freien, da sie sonst, besonders im Winter, durch vorzeitiges Absinken der Körpertemperatur zugrunde gehen.

Um die Katzen für einen Muskelversuch vorzubereiten, lässt man sie weitere 3—4 Tage (insgesamt 9—10 Tage) hungern und bringt sie dann auf eine schräge Laufbahn (Leinwand, 3 km pro Stunde, Neigung  $1/5$ ). Man lässt sie 3—4 Stunden laufen, bis sie vollständig kraftlos geworden sind und freiwillig auf der Seite liegen bleiben. Dazu eignen sich im allgemeinen kleine Katzen (1400 g) besser als grosse. Katzen, die faul sind und in der Tretbahn nicht laufen, obwohl sie ausserhalb der Tretbahn noch gut stehen und gehen können, sollen möglichst nicht zu einem Versuch verwendet werden; man muss für Muskel mit grossem Tiermaterial arbeiten, da nur jede zweite Katze brauchbar ist. Laufen die Tiere nicht freiwillig bis zur Ermattung, so gibt man nach einer Stunde eine subcutane Injektion von 20 Einheiten Insulin (= 1 mg krist. Insulin) in 1 cc subcutan. Nach etwa 2 Stunden sind sie dann (ohne Krämpfe!) soweit, dass sie freiwillig auf der Seite liegen und sich nicht mehr erheben können. Jetzt sind die Tiere für den Versuch brauchbar. Ein Unterschied im Stoffwechselverhalten zwischen den Tieren, die nur durch die Laufbahn ermüdet wurden, und den insulinbehandelten besteht nicht; durch langes Laufenlassen kann man die  $H_2$ -Donatorfreiheit der Gewebe weiter treiben als mit Insulin.

Um den Einfluss der Ermüdung auf die Kapazität des Muskels zur Oxalessigsäurereduktion zu prüfen, habe ich die Bildung der *l*-Äpfelsäure aus Oxalessigsäure bei Tieren untersucht, die verschieden lang im Laufapparat gelaufen hatten.

Bedingungen: Katze im Laufapparat; 6 km Stundengeschwindigkeit, Neigung  $1/4$ . Getötet, sofort wie üblich untersucht. Muskel und Oxalessigsäure.

Tier gelaufen:	frisch	40 min	80 min	160 min
gebildete mg <i>l</i> -Äpfelsäure pro g und Stunde. . .	14 mg	10 mg	6 mg	4 mg

Nichtgehungerte Tiere erholen sich in wenigen Minuten wieder auf die alte Gewebekapazität. Damit ist einwandfrei bewiesen, dass durch starke Muskularbeit die  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion verbraucht werden.

Den gleichen Effekt erzielt man mit Insulin. Bedingungen: Katzen 2 kg; 20 E. Insulin (1 mg krist.) subcutan. Getötet  $\times$  min nach der Injektion. Muskel und Oxalessigsäure.

	Sofort	30 min	60 min	120 min
gebildete mg <i>l</i> -Äpfelsäure pro g und Stunde. . .	12 mg	10 mg	9 mg	7 mg

Insulin hat auf die Oxalessigsäurereduktion einen ähnlichen Effekt wie Ermüdung durch Muskularbeit. Muskularbeit und Hunger sind aber wirksamer in der Donatorentfernung als Insulin.

Den gleichen Abfall der  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion fand ich in der Leber nach Adrenalin; allerdings im Verlauf mehrerer Tage.

Für den Versuch selber wurde folgendermassen vorgegangen: Die vollkommen ermatteten Tiere

wurden durch Kopfschlag getötet, Muskel oder Leber sofort herausgenommen (1 min.), sofort in der LATAPMühle gemahlen (3 min) und vom Leberbrei 30 g, vom Muskelbrei 40 g in eine Lösung von 160 ml RINGER-Lösung (ohne Calcium) und 40 ml einer gesättigten (10%)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  12  $\text{H}_2\text{O}$ -Lösung hineingegeben und durch energisches Luftdurchblasen gleichmässig verteilt (5 min).

Von dieser durch Durchblasen homogenisierten Suspension wurden je 20 ml mit einer Stangenpipette (mit sehr weiter abgebrochener Spitze von 5 mm Lochdurchmesser) in eine Lösung von 80 mg neutralisierter Oxalessigsäure (frisch, 10 min vorher aus kristallisierter Oxalessigsäure hergestellt) in 5 ml Wasser und 30 mg der auf ihre  $\text{H}_2$ -Donatorfähigkeit zu untersuchenden Substanz in neutraler Lösung in 2 ml zugegeben. Die ganze Reaktionsflüssigkeit wird in 200 ml ERLÉNMEYER-Kölbchen 5 min bei 38° im Wasserbad geschüttelt, mit je 3 ml 10 %iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 3 ml 10 %igen Natriumwolframat enteiweissst und auf *l*-Äpfelsäure untersucht.

Wegen der raschen Inaktivierung des Enzyms muss der ganze Versuch 5 Minuten nach dem Tode des Tieres beginnen und 10 Minuten nach dem Tode beendet sein. Es müssen also alle Lösungen und Gefässe vorbereitet sein. Bei Wiederholungen empfehle ich erst einige Übungsversuche.

Da auch bei diesen weitgehend donatorfreien Tieren noch eine Restmenge von  $\text{H}_2$ -Donatoren im Gewebe geblieben ist (vollständige Donatorfreiheit ist mit dem Leben unverträglich) muss in einem Kontrollversuch jedesmal der Blindwert der Oxalessigsäurereduktion festgestellt werden, der abgezogen wird. Ausserdem ist es nötig, jedesmal einen Blindversuch mitlaufen zu lassen, in dem die zu untersuchende Substanz mit Gewebe ohne Zusatz von Oxalessigsäure mitläuft, da viele  $\text{H}_2$ -Donatoren Eigendrehung zeigen, die kompensiert werden muss.

Um festzustellen, ob das betreffende Tier in seinen Geweben genügend ausgehungert war, um überhaupt mit  $\text{H}_2$ -Donatoren eine wesentliche Erhöhung der *l*-Äpfelsäurebildung zu ergeben, habe ich jedesmal neben der Bestimmung des Blindwertes eine Probe mitlaufen lassen, in der 40 mg Fructose-1,6-diphosphorsäure (aus Candiolin der I.G. mit der berechneten Menge Kaliumoxalat umgesetzt und filtriert, sorgfältig auf Abwesenheit von Ca geprüft) als  $\text{H}_2$ -Donator anwesend war. Fructosediphosphorsäure ist sowohl für Muskel als auch für Leber ein guter  $\text{H}_2$ -Donator.

Nur die Versuchsserien sind als brauchbar verwendet, in denen Fructosephosphorsäure eine mindestens 50%-ige (manchmal bis 250%-ige) Erhöhung gegen den Blindwert der *l*-Äpfelsäurebildung aus zugesetzter Oxalessigsäure ohne  $\text{H}_2$ -Donatorzusatz ergab. Wenn man die Tiere peinlich nach den angegebenen Vorschriften vorbereitet, so sind etwa 80% der Versuche brauchbar. Bei den restlichen misslungenen 20% haben die Tiere trotz der Vorbehandlung noch genügend  $\text{H}_2$ -Donatoren im Gewebe, sodass Zusätze keine Erhöhung ergeben.

Ich beschreibe im folgenden eine einzelne Versuchsserie von einem Lebertier:

Es sind jeweils 8 ERLÉNMEYER-Kölbchen von 200 ml nummeriert vorbereitet, die die untenstehenden Lösungen enthalten. Dann erfolgt Zugabe der Gewebesuspension; man schüttelt das ganze im Wasserthermostaten bei 38° 5 min lang, enteiweissst, filtriert und bestimmt die *l*-Äpfelsäure nach STRAUB.

In der ersten Rubrik gebe ich die Zutaten der 4 Versuchspaare; in der zweiten die am Polarithrometer abgelesenen Drehungen; in der dritten die aus jedem Versuchspaar errechnete Drehung aus entstandener *l*-Äpfelsäure; in der vierten die prozentuale Steigerung eines Donatorpaares gegenüber dem Kontrollpaar (1 und 2). In der fünften Rubrik erfolgt die eindeutige Entscheidung, ob eine Substanz Donator ist oder nicht.

Zutaten	Drehung	Differenz	Steigerung	$\text{H}_2$ -Donator
1. 5 ml $\text{H}_2\text{O}$ + 2 ml $\text{H}_2\text{O}$ .....	—0,06	0,28	—	—
2. 80 mg Oxalessigs. + 2 ml $\text{H}_2\text{O}$ ..... in 5 ml $\text{H}_2\text{O}$	+0,22			
3. 5 ml $\text{H}_2\text{O}$ + 40 mg Fructosediph. in 2 ml $\text{H}_2\text{O}$ ..	—0,08	0,52	95%	ja
4. 80 mg Oxalessigs. + 40 mg Fructosediph. in 2 ml $\text{H}_2\text{O}$ .. in 5 ml $\text{H}_2\text{O}$	+0,44			
5. 5 ml $\text{H}_2\text{O}$ + 30 mg Glykogen in 2 ml $\text{H}_2\text{O}$ ....	—0,28	0,28	0%	nein
6. 80 mg Oxalessigs. + 30 mg Glykogen in 2 ml $\text{H}_2\text{O}$ .... in 5 ml $\text{H}_2\text{O}$	0,00			
7. 5 ml $\text{H}_2\text{O}$ + 30 mg Isocitronens. in 2 ml $\text{H}_2\text{O}$ ..	—0,06	0,40	45%	ja
8. 80 mg Oxalessigs. + 30 mg Isocitronens. in 2 ml $\text{H}_2\text{O}$ ..	+0,34			

Nach dieser Methode, die eindeutig erlaubt, festzustellen, ob eine Substanz ein  $H_2$ -Donator der Oxalessigsäurereduktion ist oder nicht, habe ich in Muskel und Leber eine grosse Zahl von Substanzen untersucht, die ich mir unter den heutigen Verhältnissen teilweise nur schwer synthetisieren konnte.

Als allgemeines Ergebnis dieser Untersuchung ergibt sich, dass die  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion in Leber und Muskel teilweise verschieden sind. Jeder folgende Versuch ist mindestens zweimal gemacht: manche grundsätzlich wichtige, wie Glucose 4 bis 5 mal. Mit einer Katze wurde immer nur eine der obenstehenden Versuchsserien gemacht. In der folgenden Tabelle geben die Zahlenangaben jeweils die durchschnittliche Steigerung der l-Äpfelsäurebildung gegen die Kontrolle in Prozent.

Substanz	$H_2$ -Donator im Muskel	$H_2$ -Donator in der Leber
Glykogen .....	100%	0%
Glucose-6-phosphorsäure (1) .....	50	25
Fructose-1,6-diphosphorsäure .....	80	80
Ribose-5-phosphorsäure (2) .....	0	25
$\alpha$ -Glycerinphosphorsäure .....	50	20
Phosphoglycerinsäure (3) .....	0	0
Glucose .....	0	25
Fructose .....	0	10
Galactose .....	0	5 ?
Mannose .....	0	0
d-l-Sorbose .....	0	0
Arabinose .....	0	0
Xylose .....	0	0
d-Ribose (4) .....	0	25
d-l-Glycerinaldehyd .....	0	25
Dioxyaceton .....	0	0
Oxymethylglyoxal (5) .....	0	0 hemmt
Glykolaldehyd (6) .....	0	0
Formaldehyd .....	0	0
Glucoson (7) .....	0	0
Glucuronsäure .....	0	0
Gluconsäure (8) .....	0	0 hemmt
Zuckersäure (9) .....	100	60
Schleimsäure (10) .....	0	0
Mannozuckersäure (11) .....	0	0
Arabotrioxylglutarsäure (12) .....	0	0
Xylotrioxylglutarsäure (13) .....	0	0
Buttersäure .....	0	0
$\beta$ -Oxybuttersäure .....	20	30
d-Weinsäure .....	100	70

1) Dargest. nach OSTERN, GUTHKE, TERSZAKOWEC, Zs. physiol. Chem. **243**, 21 (1936). — 2) OSTERN, Bioch. Zs. **254**, 65 (1932), Inosinsäure; daraus nach LEVENE, JAKOBS, Ber. Chem. Ges. **44**, 746 (1911) Ribose-5-phosphorsäure. — 3) KIESSLING, Ber. Chem. Ges. **67**, 243 (1935). — 4) BREDERECK, Ber. Chem. Ges. **71**, 408 (1938). — 5) HYND, Biochem. J. **25**, 11 (1931). — 6) FISCHER, TAUBE, Ber. Chem. Ges. **60**, 1707 (1927). — 7) BRÜLL, Ann. Chimica applicata **26**, 415 (1936). — 8) KILLIANI, Ber. Chem. Ges. **62**, 588 (1929). — 9) E. FISCHER, Anleitung zur Darstell. org. Präparate (1920). — 10) TOLLENS, KENT, Ann. Chem. (LIEBIG) **227**, 222 (1885). — 11) E. FISCHER, Ber. Chem. Ges. **24**, 539 (1895). — 12) KILLIANI, Ber. Chem. Ges. **21**, 3006 (1888). — 13) E. FISCHER, Ber. Chem. Ges. **24**, 1836 (1895).

(Fortsetzung)

Substanz	H <sub>2</sub> -Donator im Muskel	H <sub>2</sub> -Donator in der Leber
Propionsäure .....	0%	0%
$\beta$ -Oxypropionsäure .....	0	0
Milchsäure .....	60	10
Brenztraubensäure .....	0	0 hemmt
Tartronsäure (14) .....	0	0
Mesoxalsäure (15) .....	0	0
Glycerinsäure .....	0	0 hemmt
Glykolsäure .....	0	0 hemmt
Sorbit .....	0	80
Dulcit .....	0	0
Mannit .....	0	0
Adonit (16) .....	0	0
Erythrit meso .....	0	0
Glycerin .....	0	0
Glykol .....	0	0
Äthanol .....	0	0
<i>d</i> -l-Isocitronensäure (17) .....	50	50
$\alpha$ -Ketoglutarensäure (18) .....	0	0

14) DEICHSEL, Journ. f. prakt. Chemie **93**, 203 (1864). — 15) CONRAD, REINBACH, Ber. Chem. Ges. **35**, 1817 (1902). — 16) HEYL, HART, SCHMIDT, Jl. Amer. Chem. Soc. **40**, 436 (1918). — 17) FITTIG, MILLER, Ann. Chem. (LIEBIG) **255**, 50 (1889). — 18) WISLICENUS, WALDMÜLLER, Ber. Chem. Ges. **44**, 1565 (1911); GABRIEL, Ber. Chem. Ges. **42**, 655 (1909).

Glykogen ist im Muskel ein ausgezeichneter H<sub>2</sub>-Donator, in der Leber gar keiner. Glucose-6-phosphat und Fructose-1,6-diphosphorsäure, die im Gewebe ineinander übergehen, sind in beiden Organen gute H<sub>2</sub>-Donatoren. Auch Glycerinphosphorsäure ist in beiden Organen Donator. Dagegen ist auffallenderweise Ribose-5-phosphorsäure nur in der Leber H<sub>2</sub>-Donator, nicht im Muskel.

In der Leber, nicht im Muskel, sind auch unphosphorylierte Zucker H<sub>2</sub>-Donatoren. Die Donatorspezifität ist strukturspezifisch; Glucose und *d*-Ribose, in geringer Menge Fructose und vielleicht Galactose sind H<sub>2</sub>-donatoren; Mannose, *d*-l-Sorbose, Arabinose und Xylose sind keine Donatoren. Der Nachweis der Glucose als Donator war schwierig, da nur bei extrem ausgehungerten Tieren prä mortal auch das Blut, das man in den Leberbrei mitbekommt, an Glucose soweit abnimmt, dass zugesetzte Glucose eine Erhöhung ergibt.

Die 4-Zucker waren mir leider unzugänglich; von den 3-Zuckern erwies sich der *d*-l-Glycerinaldehyd, nicht aber Dioxyaceton als guter Donator in der Leber, nicht, aber im Muskel.

Auch die Zuckersäure (nicht aber die stereoisomeren Schleimsäure und Mannozyklersäure) und die *d*-Weinsäure erwiesen sich als gute H<sub>2</sub>-Donatoren, sowohl im Muskel wie in der Leber.

Sorbit ist ein guter Donator in der Leber; nicht aber Mannit, Dulcit, Adonit (der Ribopentit) meso-Erythrit, Glycerol und Glykol. Im Muskel ist Sorbit unwirksam.

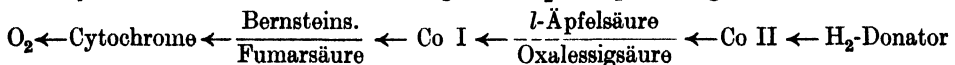
Gute H<sub>2</sub>-Donatoren der Oxalessigsäurereduktion für beide Organe sind weiter  $\beta$ -Oxybuttersäure, Milchsäure und Isocitronensäure.

Schreibt man eine Liste aller der Substanzen, die H<sub>2</sub>-Donatoren der Oxalessigsäurehydrierung sind, zusammen mit einer Liste der Substanzen, die ihren H<sub>2</sub> an Coenzym II weitergeben (soweit bekannt), so findet man eine auffallende Übereinstimmung.

Substanz	Coenzymspezifität	H <sub>2</sub> -Donator	
		Leber	Muskel
Hexosediphosphat .....	I II (EULER, ADLER 1936)	+	+
Glucose-6-phosphat .....	II (WARBURG, CHRISTIAN 1936, 1937)	+	+
Ribose-5-phosphat .....	II (DICKENS 1938)	+	—
Isocitronensäure .....	II (EULER, ADLER, PLASS 1938)	+	+
Glucose .....	I II (DAS 1936)	+	—
Glycerophosphat .....	I (ADLER, EULER, HUGHES 1938)	+	+
Milchsäure .....	I (EULER, ADLER 1936)	+	+
l-Äpfelsäure .....	I (EULER, ADLER 1936)	—	—

Sichere H<sub>2</sub>-Donatoren der Oxalessigsäurereduktion, wie Hexosediphosphat, Ribose-5-phosphorsäure, Glucose-6-phosphorsäure, Isocitronensäure, Glucose sind auch H<sub>2</sub>-Donatoren des Coenzym II. Daneben sind auch Substanzen, von denen bisher nur eine H<sub>2</sub>-Abgabe an Coenzym I bekannt war, Milchsäure und Glycerophosphat, H<sub>2</sub>-Donatoren der Oxalessigsäurereduktion.

Ich möchte trotz der vorerst widersprechenden letzten Resultate die Vermutung aussprechen, dass der Weitertransport des H<sub>2</sub> vom Hydrocoenzym II auf Oxalessigsäure erfolgt, die dadurch zu l-Äpfelsäure wird, ähnlich, wie Hydrocoenzym I seinen H<sub>2</sub> auf Fumarsäure überträgt, die dadurch zu Bernsteinsäure wird. Da Äpfelsäure von Coenzym I zu Oxalessigsäure dehydriert wird, muss die Reihenfolge des H<sub>2</sub>-transports folgende sein:



Das Enzym, das H<sub>2</sub> von Hydrocoenzym II auf Oxalessigsäure überträgt und das das höchstempfindliche bisher bekannte Atmungenzym darstellt, müsste dann die Hydrocoenzym II Dehydrogenase sein.

Diese Theorie ist direkt nur dadurch zu beweisen, dass man reines Hydrocoenzym II als H<sub>2</sub>-Donator nach meiner Versuchsanordnung untersucht. Ich besitze dank der Freundlichkeit der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Basel, 100 mg Coenzym II von der Reinheit 0,2. Es zeigte sich jedoch bei Vorversuchen, dass das Enzym, das Oxalessigsäure hydriert, sehr empfindlich gegen Hydrosulfit ist, womit man Coenzym II in die Hydroform überführt. Diesen endgültigen Versuch muss ich einem Laboratorium überlassen, das über mehr Coenzym II verfügt.

## 11. Diskussion.

Durch diese Annahme, dass das hochempfindliche Enzym, das Oxalessigsäure zu l-Äpfelsäure hydriert, identisch ist mit der Hydrocoenzym II-Dehydrogenase (vielleicht noch über zwischenliegende Faktoren), lässt sich eine der letzten Lücken im Bilde des Gesamtabbaus der Zucker schliessen. Neben dem Weg über Oxalessigsäure dürfte genau so, wie bei Coenzym I noch ein Seitenweg der Dehydrierung des Hydrocoenzym II über ein Lactoflavinderivat (Diaphorase II; HAAS, 1938; ADLER, v. EULER, GÜNTHER, 1939) direkt zu den Cytochromen gehen. Es ist wahrscheinlich, dass auch die Dehydrierung des Hydrocoenzym II im WARBURG'schen Test über eine solche Flavin-Protein Verbindung läuft.

Eine Stütze für diese Theorie sehe ich darin, dass im Tumorgewebe, wo sowohl das die Oxalessigsäure hydrierende System als auch das Succinodehydrasesystem geschädigt sind (BREUSCH 1937), sich das im Gewebe vorhandene Coenzym grossenteils in Hydrocoenzym umwandelt, wie das durch Versuche von EULER, SCHLENK, HEIWINKEL, HÖGBERG (1938) tatsächlich festgestellt wurde. Es kommt im Carcinomgewebe zu einer Stauung des Wasserstofftransports an den Coenzymen.

Schreibt man alle bekannten Tatsachen unter Annahme der Richtigkeit der obengenannten Hypothese zusammen, so erhält man (unter Einbeziehung des MEYERHOF-EMBDEN-PARNAS'schen Systems) das S. 186 wiedergegebene Schema der Atmung der Leber.





Einige wichtige Literaturzitate (ohne Vollständigkeit) sind bei jeder Reaktion angegeben. Die von mir für Leber festgestellten  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion sind gesperrt gedruckt. Die Bezeichnungen der Namen des Hauptsystems des  $H_2$ -Transports sind in Kapitalen geschrieben.

Der MEYERHOF-EMBDEN-PARNAS'sche Abbauweg wird in allen Organen durchlaufen, wenn auch in verschiedener Stärke, wie ich in einer folgenden Arbeit zeige; in manchen Organen unterbleiben einzelne Glieder dieses Weges, z.B. die Spaltung der Phosphobrenztraubensäure oder die Phosphorylierung des Glykogens, ganz.

Glykogen wird in der Leber (im Gegensatz zum Muskel) nicht mit nennenswerter Geschwindigkeit phosphoryliert. Glykogen ist in der Leber, im Gegensatz zum Muskel, kein  $H_2$ -Donator der Oxalessigsäurereduktion, obwohl die aus Glykogen im Muskel rasch entstehenden phosphorylierten Zucker auch in der Leber gute  $H_2$ -Donatoren sind.

In der Leber gibt es nach dem Schema drei Abbauwege der Kohlehydrate. Der erste ist die bekannte Gärungsspaltung in Triosephosphorsäuren, der zu Milchsäure führt. Er spielt in der Leber, im Gegensatz zum Muskel, eine untergeordnete Rolle; Leber bildet sehr wenig Milchsäure (BREUSCH 1939).

Der zweite Abbauweg ist der von WARBURG und CHRISTIAN (1936, 1937) und von DICKENS (1938) ausgedachte Abbauweg über phosphorylierte Zucker. Die Versuche beider Autoren sind hauptsächlich an Hefe gemacht worden. DICKENS fand, dass Hefe keine Oxydation der Ribose-5-phosphorsäure gibt; wohl aber oxydierte Nierengewebe 2-Ketogluconsäure. Ich zeige in der vorliegenden Arbeit, dass Glucose-6-phosphorsäure und Ribose-5-phosphorsäure Glieder dieses Abbauwegs in der Leber sind; beide sind  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion.

Der dritte Abbauweg in der Leber ist der in dieser Arbeit entdeckte Weg *d*-Glucose, *d*-Ribose, (Tetrose?), *d,l*-Glycerinaldehyd. Während bei der phosphorylierten Reihe der Hefe nach WARBURG, CHRISTIAN und DICKENS die phosphorylierten Glucon- und Ribonsäuren als Zwischenglieder festgestellt sind, ist in dieser Reihe Gluconsäure anscheinend kein Zwischenglied; sie ist kein  $H_2$ -Donator der Oxalessigsäurereduktion; sie hemmt in der Leber sogar die Reduktion. Ob der stückweise Abbau, der von der *d*-Glucose zur *d*-Ribose über eine WALDENSche Umkehrung am C3 führen muss, von der Glucose direkt zur (sehr schwer zugänglichen) Allonsäure führt, die in ihrer sterischen Konfiguration der *d*-Ribose entspricht, soll untersucht werden. Von dieser Abbaureihe ist von drei der vier beteiligten Zucker, der *d*-Glucose, *d*-Ribose und *d,l*-Glycerose \*) bewiesen, dass sie  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion in der Leber sind. Damit scheint auch die von DAS (1936) gefundene Spezifität einer Glucosedehydrogenase auf Coenzym II in der Leber erklärt (siehe Nachtrag).

Ein vierter Abbauweg existiert vielleicht in der Reihe Zuckersäure-(Ribotrioxylglutarsäure)-*d*-Weinsäure, die beide gute  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion sind. Über eventuelle Zwischenglieder dieser Reihe ist bis jetzt nichts bekannt; Glucuronsäure ist kein Zwischenglied; sie ist kein  $H_2$ -Donator.

Vom Sorbit, der ebenfalls ein guter  $H_2$ -Donator ist, geht anscheinend kein Abbauweg aus; Adonit, der Pentit der Ribose, ist eindeutig kein Donator; der der *d,l*-Weinsäure entsprechende Erythrit war mir synthetisch unzugänglich; der natürliche Mesoerythrit ist kein  $H_2$ -Donator.

Einzelstehende Donatoren der Oxalessigsäurereduktion sind Isocitronensäure (nicht  $\alpha$ -Ketoglutarsäure),  $\beta$ -Oxybuttersäure (nicht  $\alpha$ -Oxybuttersäure), Glycerophosphat (nicht Phosphoglycerinsäure). Von Isocitronensäure ist bekannt, dass sie nur über Coenzym II dehydriert wird; von  $\beta$ -Oxybuttersäure, Milchsäure und Glycerophosphat war bisher nur eine Spezifität auf Coenzym I bekannt. Wenn meine Hypothese richtig ist, müssen sich auch für diese Substanzen Dehydrogenasen finden lassen, die auf Coenzym II spezifisch sind.

Das vorgelegte Schema erklärt auch einen Befund von BACH (1939), dass Phloridzin den Kohle-

\*) Die Synthese von reinem *d*- und reinem *l*-Glycerinaldehyd ist mir hier nicht gelungen; ich musste deshalb das racemische Gemisch verwenden.

hydratgehalt von Leberschnitten durch Verhinderung der Oxydation vermehrt; Phloridzin hemmt neben anderen Reaktionen die Reduktion der Oxalessigsäure, sodass die beiden Abbauege der Leber über phosphorylierten und nicht phosphorylierten Zucker nicht funktionieren und das Kohlehydrat sich anhäuft. Ich vermute, dass diese Hemmung auch die Ursache der Phloridzinglukosurie ist. Das ist das Atmungsbild der Leber.

Im Muskel spielt der anaerobe Abbau über das MEYERHOF-EMBDEN-PARNASSEsche System die Hauptrolle. Der Abbaueweg über Glucose-Ribose-Glycerinaldehyd existiert im Muskel nicht; ob der Abbaueweg über phosphorylierte Zucker, der von WARBURG und CHRISTIAN, sowie DICKENS bisher nur für Hefe bewiesen wurde, im Muskel stattfindet, scheint zweifelhaft, da wohl Glucose-6-phosphorsäure, nicht aber Ribose-5-phosphorsäure im Muskel  $H_2$ -Donator der Oxalessigsäurereduktion ist.

Ob Glucose-6-phosphorsäure oder Fructose-1,6-diphosphorsäure oder Glycerinaldehyd-phosphorsäure im Muskel der Donator ist, ist mit meiner Versuchsanordnung unentscheidbar, da sie in einem sich sehr rasch einstellenden Gleichgewicht miteinander stehen. Es ist wahrscheinlich, dass Triosephosphorsäuren die  $H_2$ -Donatoren sind, da Fructose-1,6-diphosphorsäure, die den Triosephosphaten nähersteht als Glucose-6-phosphorsäure, ein besserer  $H_2$ -Donator ist. Danach ist zu vermuten, dass Glucose-6-phosphorsäure im Muskel überhaupt kein Donator ist, ebenso wenig wie Glykogen, das seine Donatorfähigkeit im Muskel seiner raschen Umwandlungsfähigkeit zu phosphorylierten Zuckern verdankt.

Möglicherweise ist im Muskel nicht Oxalessigsäure, sondern Brenztraubensäure der  $H_2$ -Acceptor dieser Abbaureihe.

Soweit bisher zu übersehen, wird im Muskel (im Gegensatz zur Leber) Zucker nur über das MEYERHOF-EMBDEN-PARNASSEsche System abgebaut.

Zuckersäure und *d*-Weinsäure sind auch im Muskel  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion. Dagegen ist Sorbit im Muskel (im Gegensatz zur Leber) kein Donator. Isocitronensäure, Milchsäure,  $\beta$ -Oxybuttersäure und Glycerinphosphorsäure sind (ebenso wie in der Leber)  $H_2$ -Donatoren.

Insulin und Adrenalin. Ich habe im Rahmen dieser Arbeit sorgfältig jede einzelne Reaktion daraufhin untersucht, ob sie sich durch Zusatz von Insulin (rein; Zn frei) oder Adrenalin beeinflussen liessen. Ich habe bei keiner einzigen einen Einfluss feststellen können, mit Ausnahme der vorher erwähnten *in vivo* Versuche bei denen Insulin die  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion im Muskel vermindert, während Adrenalin die  $H_2$ -Donatoren in der Leber herabsetzt. Insulin und Adrenalin sind also sicher in keinem der  $H_2$ -Transportmechanismen limitierende Faktoren.

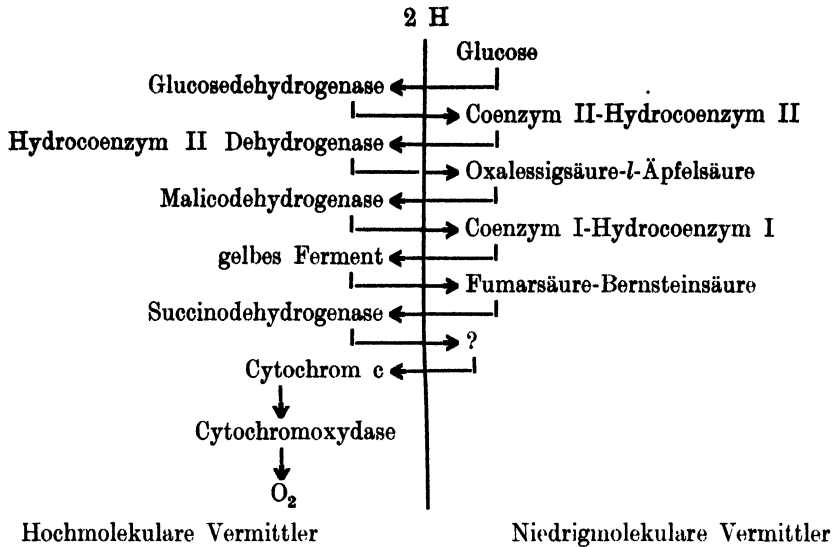
## 12. Die Wechselregel.

Schreibt man sich das Seite 186 angegebene Schema der  $H_2$ -Transportfolge in Zickzackform, so, dass die hochmolekularen Eiweisszwischentransporteur des  $H_2$  auf die eine Seite, die niedrigmolekularen Transporteur des  $H_2$  auf die andere Seite kommen, so kommt man zu einer Regel, dass im Wasserstofftransport im Gewebe immer ein hochmolekulares, schwer diffusibles, praktisch in der Zelle ortfestes Eiweiss und ein niedrigmolekularer, im Zellinhalt leicht diffusibler Zwischenträger miteinander abwechseln.

Das nenne ich die Wechselregel. Sie versteht sich eigentlich aus physikalischen Gründen von selbst. Die grossen Eiweissmoleküle der Dehydrogenasen haben meistens nur eine oder ganz wenige wirksame Gruppen im Molekül. Würde das gesamte  $H_2$  des Abbaus von einem Proteinmolekül direkt zum nächsten gebracht werden müssen, so wäre die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens gerade der wirksamen Gruppen an dem grossen Eiweissmolekül sehr klein, die Atmung also sehr klein.

Anders verhält es sich dagegen, wenn kleine, sehr rasch bewegliche Moleküle den  $H_2$  von einem Enzymprotein zum nächsten transportieren; die Wahrscheinlichkeit von Reaktionszusammenstössen wächst dadurch beträchtlich.

Diese Regel scheint von der Glucose bis zur Succinodehydrogenase zu gelten. Als Vermittler von Succinodehydrogenase zum Cytochrom c und zur Cytochromoxydase sind bis jetzt



keine niedrigmolekularen Vermittler bekannt. Ob solche noch gefunden werden, oder ob die starke Polarität der Eisenhaltigen Häminenzyme auch ohne niedrigmolekulare Zwischenträger genügend Reaktionszusammenstöße erzwingt, muss noch entschieden werden. Es ist auch zu bedenken, dass nur vom Zucker bis zur Succinodehydrogenase wirklich H<sub>2</sub> oder besser gesagt ein Protonenpaar transportiert wird, während von da ab über die eisenhaltigen Fermente wahrscheinlich nur noch Elektronen transportiert werden. Ein wasserlösliches „Coenzym“ der Succinodehydrogenase wurde von STERN und MELNICK (1938) gefunden; es ist jedoch ein hochmolekulares Protein. Hier hat die Wechselregel eine Lücke.

### Ergebnisse.

1. Vom Hydrocoenzym I führen zwei Hauptwege zum Sauerstoff: einer über Diaphorase I — Cytochrom a und b, und einer über gelbes Ferment-Succinodehydrogenase-Cytochrom c. Dieser letzte Weg ist, wie aus den Hemmungen der einzelnen Gewebsatmungen durch Malonat ersichtlich ist, der eigentliche Hauptweg; die Variation der Atmung der verschiedenen Gewebe wird durch die Variation dieses Weges verursacht.

2. In allen Organen, die nach BREUSCH (1939) Oxalessigsäure reduzieren (Muskel, Leber, Niere, Pancreas, Hirn), kann der grösste Teil der Atmung durch die Oxalessigsäurereduktion und durch das Gegenstück, die Oxydation der l-Äpfelsäure, getragen werden. In allen Organen, die Oxalessigsäure nicht reduzieren (Lunge, Milz, Hoden, Placenta, Embryo, Nerv), ist auch die Oxydation der l-Äpfelsäure 20 bis 30 mal schwächer.

3. Es werden zwei Gruppen von grundsätzlich verschieden atmenden Geweben aufgestellt; solche, die nur über Coenzym I (System I) atmen, und solche, die über Coenzym I und Oxalessigsäure (System II) atmen. Alle Gewebe, die über System I + II atmen, sind gute Atmer; alle, die nur über System I atmen, sind schlechte Atmer.

4. Am postmortalen Atmungsabfall von Geweberei in RINGERphosphatlösung wird gezeigt, dass dieser Abfall ebenfalls in zwei scharf getrennte Gruppen zerfällt: die Atmung der Organe des Systems I + II fällt postmortal rasch ab; die Atmung der Organe des Systems I bleibt lange konstant.

5. Die Ursache des raschen postmortalen Abfalls der Atmung von System II liegt in der raschen postmortalen Inaktivierung des Enzyms, das Oxalessigsäure zu l-Äpfelsäure hydriert. Es ist das höchstempfindliche bisher bekannte Atmungsenzym und zer-

fällt im Gewebeprei bei 38° bereits 30 min nach dem Tode auf die Hälfte; im Gewebeschnitt sinkt es unter gleichen Bedingungen auf zwei drittel; das ist der Grund, warum Schnitte länger atmen als Brei.

6. Das System II wird spezifisch durch Calcium gesteuert; bereits eine Erhöhung des Ca von 10 auf 15 mg % setzt die Kapazität des Systems II um 30% herab. System I wird auch mit 5 facher Ca-Dosis gar nicht beeinflusst. Demgemäss wird nur die Organgruppe des Systems II (Muskel, Leber, Niere, Pancreas, Hirn), die über Oxalessigsäure atmet, durch Calcium in ihrer Atmung geschädigt, die Gruppe des Systems I dagegen gar nicht (Lunge, Milz, Hoden, Embryo, Placenta, Nerv). Von dieser Möglichkeit der Atmungssteuerung durch Calciumveränderungen macht der Körper beim Zwang zu erhöhter oder erniedrigter Wärmeproduktion jedoch keinen Gebrauch.

7. Phosphat steigert in allen Geweben (als Brei in RINGERbicarbonat) die Atmung; die der Organe des Systems II wird besonders gesteigert, weil Phosphat spezifisch die Reduktion der Oxalessigsäure zu *l*-Äpfelsäure fördert. Das Förderungsmaximum liegt bei 200 mg % P.

8. In erneuter Ablehnung des KREBS'schen Citronensäurecyclus wird nachgewiesen, dass in neutraler calciumhaltiger Oxalessigsäurelösung bereits durch Autocondensation (katalysiert durch Calcium) Produkte entstehen, die die Pentabromacetonreaktion geben, also als „Citronensäure“ mitbestimmt werden. Es wird am Taubenmuskel nachgewiesen, dass die einzelnen Glieder des hypothetischen Citronensäurecyclus, die zwangsläufig durchlaufen werden müssen, bis zu 50 mal langsamer in *l*-Äpfelsäure umgewandelt werden, als Oxalessigsäure selbst. Weiter wird in anaeroben Versuchen nachgewiesen, dass (unter Annahme der Richtigkeit des Cyclus) etwa 100 mal mehr Sauerstoff zur erzielten Oxalessigsäure-*l*-Äpfelsäureumwandlung nötig gewesen wäre, als tatsächlich im ganzen Reaktionssystem war. Der Cyclus wird erneut als Atmungssystem abgelehnt.

9. Der Einfluss von Pharmaka auf die Systeme I und II wird untersucht. System II ist allgemein sensibler; einige Antipyretika (Chininsulfat und Salizylat; auch Digitalin) greifen spezifisch am System II (Oxalessigsäurereduktion) ein.

10. Durch ein neues Verfahren werden die  $H_2$ -Donatoren der Oxalessigsäurereduktion festgestellt. Dabei lassen sich für die Leber zwei Abbauege der Zucker feststellen: a) Glucose-6-phosphorsäure — Ribose-5-phosphorsäure — Triosephosphorsäure, und b) ein phosphorfreier Abbauege Glucose — Ribose — Glycerinaldehyd; beide Reihen geben ihren Wasserstoff an Oxalessigsäure ab. Im Muskel existiert keine dieser Reihen.

Es ergibt sich eine auffallende Übereinstimmung der bisher bekannten  $H_2$ -Donatoren für Coenzym II und der hier gefundenen  $H_2$ -Donatoren für die Reduktion der Oxalessigsäure. Es wird die Vermutung ausgesprochen, dass der am Coenzym II gesammelte Wasserstoff als Hauptreaktion von der Oxalessigsäure aufgenommen und über Malicodehydrogenase an Coenzym I weitergegeben wird. Das Enzym, das Oxalessigsäure in *l*-Äpfelsäure verwandelt, ist demnach wahrscheinlich identisch mit der Hydrocoenzym II-Dehydrogenase.

11. In der Diskussion wird, auf diese Theorie aufgebaut, ein lückenloses neues Schema des  $H_2$ -Transports von der Glucose bis zum Sauerstoff aufgestellt.

12. Eine Regel wird aufgestellt, dass im  $H_2$ -Transport zum  $O_2$  (der Atmung) immer ein hochpolymerer Eiweissträger (Dehydrase) und ein niedrigmolekularer Zwischenträger ( $C_4$ -Dicarbonsäuren, Coenzyme) abwechseln. Die vermutete Regel wird als Wechselregel bezeichnet.

Ich habe die Ehre, Herrn Prof. v. EULER, Stockholm, für reine Cozymase, Prof. HÖRLEIN von der I.G. Farbenindustrie für reines Dioxyceton, der Firma HOFFMANN-LA ROCHE in Basel für Coenzym II vom Reinheitsgrad 0,2 und der Firma ORGANON, Oss, Holland, für 2 g reines Insulin zu danken. Ausserdem bin ich Herrn Professor PARNAS, Lwow, USSR, und Herrn Professor HAUROWITZ, Istanbul, für guten Rat in einigen schwierigen Fragen dieser Arbeit dankbar.

1) Adler, v. Euler, Günther, *Nature* **143**, 641 (1939). — 2) Adler, v. Euler, Hughes, *Zs. physiol. Chem.* **252**, 1 (1938). — 3) Adler, Michaelis, *Zs. physiol. Chem.* **238**, 261 (1936). — 4) S. Bach, *Biochem. J.* **33**, 802 (1939). — 5) Banga, Ochoa, Peters, *Biochem. J.* **33**, 1109 (1939). — 6) Banga, Szent-Györgyi, *Zs. physiol. Chem.* **245**, 113 (1937). — 7) Battelli, Stern, *Bioch. Zs.* **21**, 487 (1909); **33**, 315 (1911); **36**, 114 (1911). — 8) Benjamin, Hess, *Jl. of Biol. Chem.* **100**, 27 (1933). — 9) Behrendt, *Bioch. Zs.* **144**, 72 (1924). — 10) Breusch, *Bioch. Zs.* **295**, 101 (1937). — 11) Breusch, *Zs. physiol. Chem.* **250**, 262 (1937). — 12) Breusch, *Biochem. J.* **33**, 1757 (1939). — 13) Mc Callum, Voegtlin, *Jl. of Exp. Med.* **11**, 118 (1909). — 14) Cori, Cori, Schmidt, *Jl. of Biol. Chem.* **129**, 629 (1939). — 15) Das, *Zs. physiol. Chem.* **238**, 269 (1938). — 16) Dickens, *Biochem. J.* **32**, 1628 (1938). — 17) Dickens, Greville, *Biochem. J.* **29**, 1468 (1935). — 18) Dixon, *Ann. Rev. of Biochem.* 1939, I. — 19) Engelhard, Barchash, *Biokhimija* **3**, 500 (1938); nach *Ber. ges. Phys.* **118**, 650 (1939). — 20) Elliot, Greig, *Biochem. J.* **32**, 1407 (1937). — 21) v. Euler, Adler, Hellström, *Sv. kem. Tidskr.* **47**, 290 (1935). — 22) v. Euler, Hasse, *Naturwiss.* **26**, 187 (1938). — 23) v. Euler, Günther, *Naturwiss.* **26**, 676 (1938). — 24) v. Euler, Adler, Günther, *Zs. physiol. Chem.* **247**, 65 (1937). — 25) v. Euler, Adler, Plass, *Ark. för Kemi.* **13 B No. 4 I** (1938). — 25a) v. Euler, Schlenk, Heiwinkel, Högberg, *Zs. physiol. Chem.* **256**, 208 (1938). — 26) v. Euler, Adler, *Zs. physiol. Chem.* **238**, 233 (1936). — 27) F. G. Fischer, Eysenbach, *Ann. Chemie Pharm. (Liebig)* **530**, 99 (1937). — 28) E. Frank, *Zs. exp. Med.* **24**, 341 (1921). — 29) Goreczky, v. Ludany, *Klin. Ws.* **1938**, II, 1544. — 30) Green, Brosteaux, *Biochem. J.* **30**, 2109 (1936). — 31) Green, Dewan, Leloir, *Biochem. J.* **31**, 934, 1069 (1937). — 32) Greville, *Biochem. J.* **33**, 718 (1939). — 33) Greig, Munro, *Biochem. J.* **33**, 143 (1939). — 34) Haas, *Bioch. Zs.* **298**, 378 (1938). — 35) Hollmann, *Zs. physiol. Chem.* **258**, 178 (1939). — 36) Jowett, Quastel, *Biochem. J.* **27**, 486 (1933). — 37) Holk, *Skand. Arch. Phys.* **70**, 273 (1934). — 38) Knoop, Martius, *Zs. physiol. Chem.* **242**, I (1936). — 39) Krebs, *Bioch. Zs.* **238**, 174 (1931). — 40) Krebs, Eggleston, *Biochem. J.* **32**, 913 (1938). — 41) Krebs, *Biochem. J.* **34**, 460, 775 (1940). — 42) Laki, *Zs. physiol. Chem.* **249**, 61 (1937). — 43) Lohmann, *Bioch. Zs.* **262**, 137 (1933). — 44) Leicher, *D. Arch. klin. Med.* **141**, 85 (1922). — 45) Lipschitz, *Arch. internat. Pharm.* **53**, 200 (1936). — 46) Meyerhof, *Arch. ges. Phys. (Pflüger)* **175**, 20 (1919). — 47) Meyerhof, Ohlmeyer, *Bioch. Zs.* **297**, 90, 113 (1938). — 48) Needham, Pillai, *Biochem. J.* **31**, 1837 (1937); **32**, 2040 (1938). — 49) Negelein, Brömel, *Bioch. Zs.* **300**, 225 (1939). — 50) Salvesen, *Jl. of Biol. Chem.* **56**, 443 (1923). — 51) Starkenstein, *Arch. für exp. Path.* **77**, 60 (1914). — 52) Stern, Melnik, *Nature* **144**, 390 (1939). — 53) Straub, *Nature* **141**, 603 (1938); **143**, 76 (1939). — 54) Straub, *Biochem. J.* **34**, 483 (1940). — 55) Szent-Györgyi, Annau, Banga, Gösz, Laki, Straub, *Zs. physiol. Chem.* **236**, 1 (1935). — 56) Thunberg, *Skand. Arch. Phys.* **23**, 154 (1909). — 57) Warburg, Christian, *Bioch. Zs.* **287**, 440 (1936). — 58) Warburg, Christian, *Bioch. Zs.* **292**, 287 (1937). — 59) Warburg, Christian, *Bioch. Zs.* **298**, 150 (1938). — 60) Warburg, *Ber. Chem. Ges.* **69**, 1557 (1936). — 61) Warburg, *Zs. physiol. Chem.* **66**, 305 (1910). — 62) Winterstein: *Die Narkose*, Berlin, 1926.

Nachtrag bei der Korrektur: Bei neuen Versuchen hat sich die *d*-Allonsäure, eine der beiden sterisch zur *d*-Ribose gehörenden Hexonsäuren, als guter H<sub>2</sub>-Donator der Oxalessigsäurereduktion erwiesen; ebenso *d*-Galactonsäure.

Ich danke Herrn Prof. REICHSTEIN, Basel, für die Überlassung von *d*-Allonsäurelacton.

# Sulle proteasi degli acidoproteoliti

DI

L. GORINI

(Labor. di Ric. della S. A. Boniscontro e Gazzone, Torino)

(20.III.41.)

Gli acidoproteoliti, le cui prime specie furono scoperte da COSTANTINO GORINI (1892—94) <sup>1, 2</sup>), devono il loro nome alla seguente caratteristica comune principale, che ne fa un gruppo speciale di batteri differenziandoli tipicamente dagli altri batteri proteolitici: di attaccare contemporaneamente le sostanze proteiche e le idrocarbonate, onde sono capaci di proteolizzare in ambiente acido. Già dal 1892 (1, 2) agli albori della enzimologia batterica, in occasione dei suoi primi lavori sull'argomento, C. GORINI dimostrava che il *B. prodigiosum* coagula il latte per duplice via: per acidificazione, attaccando il lattosio, e per presame e successiva digestione, attaccando la caseina. Successivamente dimostrò le stesse proprietà presso numerose specie batteriche sia saprofitiche che parassite (3). Il loro numero fu accresciuto da altri autori. Lo stesso fenomeno ottenuto sul latte, venne, ottenuto anche su gelatina lattosata che, pure diventando acida per saccarolisi, viene liquefatta contemporaneamente (1902) (4).

Ora, alla distanza di 50 anni, l'enzimologia batterica e soprattutto i metodi di ricerca si sono affinati e non mancano pubblicazioni modernissime al riguardo. Si è quindi imposta la necessità di cimentare anche le specie acidoproteolitiche GORINI ai metodi di ricerca suddetti. Già nel 1930 C. GORINI stesso, in collaborazione con W. GRASSMANN e H. SCHLEICH <sup>5</sup>), pubblicava i risultati di ricerche eseguite in questo senso sull'*Enterococcus* (var. *acidoproteolitica* G.) lavorando su liquidi enzimatici ottenuti col metodo della filtrazione amicrobica da lui inaugurato in occasione della scoperta della chimasi del *B. prodigiosum* (1892) (1), avendo fin da allora intuito la necessità ed importanza di distinguere l'attività vitale dalla produzione enzimatica che ne deriva. Venne così dimostrata in culture di 7 giorni la presenza di una proteinasi agente sulla caseina del latte in ambiente leggermente acido e sulla gelatina in ambiente neutro. Gli autori concludono non possa trattarsi di una tripsina poichè nelle condizioni optimum per la tripsina non si osserva digestione nè sulla caseina nè sulla gelatina, ma che la proteinasi trovata si debba classificare in una posizione intermedia tra il tipo tripsinico ed il papainico. Nella massa dei corpi batterici e della caseina indisciolta vien dimostrata inoltre la presenza di peptidasi agenti in ambiente leggermente alcalino.

Seguendo metodi del tutto differenti, lavorando cioè sulle culture stesse e non sui liquidi enzimatici da queste isolati, A. JANOSCHEK (1934) <sup>7</sup>) si è pure occupato dell'argomento. Egli ha preso in esame i seguenti ceppi acidoproteolitici: *Caseococcus* Gor., *Gastrococcus* Gor., *Mammococcus* Gor., *Bacillus acidificans praesamigenes casei* Gor. Culture in latté vengono seguite nel tempo sino ad un periodo di incubazione massima di 18 giorni, determinandone di volta in volta l'aumento di acidità e l'aumento della proteina digerita (N solubile in metanolo espresso in % dell'N totale). A parte non rilevanti differenze quantitative tra i vari ceppi egli trova che partendo dal pH iniziale di 6,5 del latte sterile, la quantità di acido presente aumenta gradatamente sino a raggiungere dopo 18 giorni di incubazione un massimo di pH intorno a 4,5. Parallelamente aumenta pure gradatamente la quantità di proteina digerita che dopo 18 giorni per alcuni ceppi raggiunge sino il 50% della proteina presente. Se però il latte sterile è stato ad arte reso più acido prima dell'inoculazione, si osserva che qualunque sia il pH di partenza, il massimo raggiunto dopo 18 giorni di incubazione è sempre il medesimo, intorno a 4,5. Parallelamente la quantità di proteina digerita è gradatamente minore con l'aumentare dell'acidità di partenza. Insomma si ha l'impressione, dice lo JANOSCHEK, come se l'acidità iniziale del mezzo culturale aumentata ad arte, permetta ai microrganismi di sviluppare energie proteolitiche e saccarolitiche in quella stessa misura soltanto nella quale essi in analoghe condizioni

le svilupperebbero ancora a partire dal momento in cui hanno raggiunto da sè stessi una acidità analoga. L'attività proteolitica dunque delle culture è ostacolata in modo crescente dall'aumentare della loro acidità sia prodottasi naturalmente per effetto dell'incubazione, sia ottenuta artificialmente con aggiunta di soluzioni tampone prima dell'inoculazione: è ridotta quasi a zero a pH 4,5, aumenta gradatamente andando verso 6,5 ed ha il suo maxima a 6,5 od oltre.

Io, operando sui filtrati enzimatici sterili ottenuti da culture di *Mammococcus* I Gor. (Syn. *Streptococcus liquefaciens*) (1935) (8) ho dimostrato la presenza di proteinasi agenti nella zona acida anche sulla gelatina, caratteristica delle papainasi.

Più completamente G. GORBACH riuscì ad analizzare il sistema proteasico degli acidoproteolitici accordandolo maggiormente alla specifica loro proprietà. In una serie di lavori egli dimostrò innanzitutto (1935) (9) che la proteinasi già trovata dai precedenti ricercatori è attivabile con acido cianidrico e quindi sempre più avvicinata al tipo papainico. Inoltre (1937) (10) accanto alle proteinasi e peptidasi già trovate dimostrò la presenza di un secondo sistema acidoproteasico costituito da una acidoproteinasi e da una acidopeptidasi aventi il pH optimum in reazione nettamente acida \*). Nelle sue ricerche egli impiega latte normale, non disgenesico, raccolto igienicamente, fresco, inalterato e sterilizzato blandamente secondo le prescrizioni di C. GORINI. Generalmente invece gli autori usano come terreno di cultura un latte comune la cui raccolta non è stata curata in modo speciale e che quindi, data la sua elevata carica batterica, deve venir sterilizzato energicamente, denaturando conseguentemente in modo più o meno profondo, in particolare il suo contenuto proteico. Evidentemente anche le più piccole variazioni nelle condizioni di vita portano a corrispondenti variazioni nei rapporti qualitativi e quantitativi dei costituenti il sistema proteasico del microrganismo. A questo riguardo mette conto di notare che la proprietà di proteolizzare in ambiente acido è la caratteristica costitutiva degli acidoproteoliti stessi; però non si infirma per nulla tale dato di fatto, anzi si è più aderenti alla realtà, se per il sistema proteasico degli acidoproteoliti, come appunto C. GORINI ha recentemente proposto per la classificazione degli enzimi batterici in generale, si sostituisce l'appellativo costitutivo coll'appellativo abituale, in base al concetto che tutti gli enzimi propri di un microbo siano costitutivi, costituzionali, permanenti, colla semplice differenza quantitativa che alcuni (abituati) si manifestano in tutte le condizioni, mentre altri (adattivi) si manifestano solamente in alcune condizioni (11).

E. CORBERI (1938) (12) in uno studio morfologico e biologico eseguito sui ceppi: *Mammococcus* Gor., *Caseococcus* Gor., *Gastrococcus* Gor., riprende le ricerche direttamente sulla cultura stessa confermando ed ampliando le conclusioni di A. JANOSCHEK. La morfologia ed il comportamento dei vari ceppi è abbastanza simile per farne un gruppo particolare di cocchi caseolitici analoghi come vuole GORINI anziché altrettante specie come alcuni A. penserebbero. Il pH massimo raggiunto dalle culture è di 4,4 e ciò in un tempo massimo di 8 giorni. La proteolisi (formolitolazione sec. SÖRENSEN eseguita sulla cultura stessa) continua ad aumentare durante i primi 21 giorni, indi prove dopo 52 giorni dimostrano che essa non si arresta ma si rallenta grandemente. L'acidità del mezzo alla semina del microrganismo ne influenza lo sviluppo: così a pH 4,4—4,6 le culture stentano a svilupparsi. Ciò è importante perchè può porre sotto diversa luce le osservazioni di A. JANOSCHEK nel senso che la da lui osservata minor proteolisi in mezzi culturali preventivamente acidificati, può e deve essere ricondotta anche ad un conseguente minore sviluppo delle culture oltre che ad una azione ostacolante dell'acidità sul sistema enzimatico da esse prodotto.

Lasciando da parte le questioni relative alla composizione qualitativa sopraccennata e basandomi soltanto sulle proteasi corrispondenti alle batteriche più comuni: la proteinasi a tipo papainico agente in mezzo leggermente acido e le peptidasi agenti in mezzo leggermente alcalino, in una serie di ricerche ho voluto chiarire meglio il meccanismo di produzione e di conservazione di tali enzimi in rapporto all'invecchiamento delle culture ed al conseguente incremento di acidità del mezzo. Ciò a delucidazione e completamento di quanto, dall'esame

\*) Acidopeptidasi (ma non acidoproteinasi) furono trovate recentemente da BERGER, JOHNSON e PETERSON in altri batteri (Jl. of Bact. 86, 521, 1938).



degli studi sinora fatti sugli acidoproteoliti, risulta necessitare di ulteriore chiarimento.

Da culture di *Enterococcus* incubate per 7 giorni e che erano sede di una evidentemente vivace attività proteolitica, C. GORINI nel lavoro già citato (5) aveva ottenuto dopo filtrazione per candela, soluzioni enzimatiche sterili di attività molto piccola. Io operando nella stessa maniera sul *Mammococcus*, ottenni valori tanto bassi da rientrare quasi nell'ordine di grandezza degli errori di esperienza. Escluso con prove preliminari che potesse trattarsi di adsorbimento da parte del materiale (candela BERKEFELD, amianto SEITZ, membrana) usato nella filtrazione, ho istituite prove comparative per stabilire se vi sia una dipendenza tra l'attività enzimatica del filtrato e l'età della cultura da cui deriva.

E' stato così possibile stabilire come l'entità dell'attività proteinasica dei filtrati ottenuti, sia in stretta dipendenza con l'incremento della concentrazione degli idrogenioni nelle culture da cui derivano, incremento che segue di pari passo l'invecchiamento delle culture stesse. Così culture che all'inoculazione hanno un ph intorno ai 6,5 e che al momento dell'inizio della coagulazione dopo cioè 15—20 ore di incubazione a 37°, segnano un ph intorno ai 5, hanno dato dei filtrati proteoliticamente molto attivi; mentre dopo 7—8 giorni di incubazione, il ph delle culture raggiunge il limite massimo di 4,5 ed i filtrati che se ne ottengono sono pressoché inattivi.

Infatti la zona di massima stabilità della proteinasi del *Mammococcus* è praticamente limitata tra ph 6 e ph 8; oltre questi limiti essa è più o meno rapidamente distrutta. Nella zona acida che è quella che maggiormente ci interessa, essa è inattivata se è mantenuta a ph 4 anche soltanto per un'ora e perde del 50% della sua attività dopo 4 giorni a ph 4,6 e del 40% dopo un mese a ph 5.

Per quanto riguarda quindi la proteinasi del *Mammococcus*, anche se prodotta continuamente durante lo sviluppo della cultura e la conseguente autolisi delle sue cellule, come è dimostrato dal graduale aumento della proteolisi della cultura stessa (JANOSCHEK 7)), essa si viene a trovare in un ambiente sempre più sfavorevole di mano in mano che progredisce la saccarolisi e quindi aumenta l'acidità del liquido culturale. Se di conseguenza si arresta improvvisamente la vita della cultura e se ne separano i corpi batterici, il liquido culturale sterile ottenuto sarà nelle condizioni migliori per quanto riguarda le proteinasi se deriva da culture ben sviluppate ma di breve incubazione che non abbiano ancora raggiunta la massima acidità e cioè che non abbiano ancora sorpassato il ph 5; praticamente quando comincia la coagulazione, dopo 18—20 ore a 37°.

Che altri fattori, oltre l'aumento dell'acidità, non entrino durante l'invecchiamento della cultura a provocare la diminuzione di attività dei filtrati enzimatici che se ne ottengono, è dimostrato dal fatto che se si aggiunge alla cultura del carbonato di calcio in modo da mantenerne il ph intorno ai 5, il filtrato enzimatico che se ne deriva si dimostra attivo anche se la cultura stessa è stata incubata a 37° per parecchi giorni.

Nell'identico modo ho studiato il comportamento delle peptidasi che il *Mammococcus* I.G. pure produce.

I filtrati sterili ottenuti nel solito modo, paragonati tra loro a seconda dell'età delle culture da cui derivano, dimostrano per quanto riguarda l'azione peptidasica, una attività più o meno grande, più o meno evidente, sempre però molto limitata, dipendente dal ph raggiunto dalle culture da cui derivano come avviene per le proteinasi. A differenza di quest'ultima però, essi si dimostrano ancora attivi per quanto riguarda la dipeptidasi, anche quando derivano da culture che abbiano raggiunto il ph di 4,6 e quindi già pressoché inattivi per quanto riguarda la proteinasi. Culture invece molto giovani che danno filtrati di rilevante attività proteinasica, sono pressoché inattive per le peptidasi. Insomma l'attività peptidasica in rapporto all'età della cultura, insorge nel liquido culturale più tardi di quella proteinasica, ma dura più a lungo sempreché beninteso il filtrato che sia a ph 4,8—4,6, venga, non appena ottenuto sterile, portato con soda ad un ph oltre il 5,5. Ciò per evitare che le peptidasi vengano in qualche ora rapidamente distrutte.

Le conclusioni surriferite sono però soltanto il risultato della media di moltissime determinazioni di valori molto piccoli, non lontani dai limiti massimi degli errori di esperienza. Nello

intento di indagare anche per l'attività peptidasica come è stato fatto per la proteinasica per quale ragione nelle condizioni date di esperienza essa si dimostri di così piccola entità, venne preventivamente provato che ciò in linea di massima non è dovuto ad un ostacolamento causato dalla presenza dei prodotti di digestione come da altri fu per esempio osservato sugli enzimi del lievito (13): infatti dializzando il liquido culturale si ottiene un certo vantaggio ma l'azione si mantiene sempre modesta.

E' necessario ora rivolgere l'attenzione alla parte solida della cultura che nella filtrazione rimane sopra il filtro. Essa è costituita dai corpi batterici che però nelle ordinarie culture in latte, risultano diluiti in una gran massa costituita dal coagulo di caseina che, specialmente se la cultura è di incubazione recente, è ancora quasi completamente indiscioltto. Ho pensato allora di preparare culture usando come terreno del latte scremato, parzialmente digerito con pancreatina e da cui è stata eliminata la rimanente caseina per acidificazione e filtrazione e la lattalbumina per ebullizione dopo aver aggiustato il ph, e successiva centrifugazione. Le culture su tale terreno, se il latte è stato digerito per un tempo sufficiente, raggiungono abbastanza celermente il ph massimo di 4,8—4,6, su per giù come avviene con quelle su latte ordinario. Certamente in questo modo si alterano le condizioni del substrato normale di vita del batterio per le modificazioni introdotte sia nel contenuto proteico sia nei suoi rapporti proporzionali col lattosio e cogli altri componenti del latte; ma si è scelta questa via allo scopo preciso di poter determinare l'attività enzimatica dei corpi batterici stessi isolati dal liquido culturale senza la contemporanea presenza della caseina precipitata. Ciò, sia per lavorare su autolisati più puri e sia specialmente per escludere il dubbio che gli enzimi, eventualmente trovati, fossero da ascrivere non ai corpi batterici ma a quelli del liquido culturale adsorbiti dalla proteina precipitata.

Gli autolisati ottenuti dai corpi batterici centrifugati, lavati ed uccisi con toluolo, posseggono una attività dipeptidasica ingentissima e polipeptidasica pure forte benchè minore, indipendentemente dalla durata dell'incubazione delle culture da cui derivano e quindi dal ph raggiunto dal liquido culturale stesso. Quest'ultimo invece, come al solito, mostra attività proteinasica solo se deriva da culture giovani che non abbiano ancora oltrepassato il ph 5. Gli autolisati dei corpi batterici posseggono una attività proteinasica molto debole e che diminuisce col diminuire di quella posseduta dal liquido culturale corrispondente e molto probabilmente si tratta di tracce di quest'ultimo non ben dilavate dai corpi batterici stessi.

Coordinando le precedenti osservazioni con quelle fatte sulle culture in latte normale, se ne deriva lo schema seguente: le proteinasi e le peptidasi costituenti il sistema enzimatico proteolitico del *Mammococcus* I G., sono le prime ectoenzimi che passano nel liquido culturale, le seconde endoenzimi che rimangono nell'interno della cellula e si trovano quindi nei corpi batterici. Resta così dimostrata in modo definitivo la spiegazione già avanzata per l'*Enterococcus* G. (5) in correlazione a quanto A. I. VIRTANEN e J. TARNANEN avevano allora trovato per l'alcalinoproteolitico *B. fluorescens liquefaciens* (14). Le prove infatti su latte digerito eliminano il dubbio che sia la caseina precipitata che per adsorbimento trattenga uno degli enzimi del liquido culturale. D'altra parte grazie al biochimismo speciale degli acidoproteoliti si ha qui una nuova dimostrazione della corrispondenza alla realtà nella distinzione tra endo ed ectoenzimi. Infatti si osservi che anche le peptidasi del *Mammococcus* I G., come le proteinasi, si dimostrano instabili all'azione della acidità del mezzo e a ph 4,6 vengono subito distrutte. Si spiega facilmente quindi come, malgrado l'inevitabile autolisi delle cellule che sin dall'inizio, di mano in mano vengono a morire durante l'incubazione della cultura, sia possibile trovare gli enzimi nei corpi batterici e nel liquido culturale così nettamente distinti. Va qui ricordato come del resto sin da quasi 50 anni fa C. GORINI<sup>4</sup>) studiando la chimasi prodotta dal *B. prodigiosum*, avanzasse già allora l'ipotesi sull'esistenza di ectoenzimi secreti dalla cellula vivente: „La chimasi del *B. prodigiosus* non deve essere un prodotto dell'autolisi cellulare, infatti la capacità coagulante delle culture liberate dalle cellule per filtrazione, non aumenta con l'età delle culture stesse”.

Quanto sopra contribuisce a chiarire come gli acidoproteoliti possano vivere e proteolizzare la caseina in un ambiente che si trova ad un ph corrispondente al punto isoelettrico della caseina stessa che quindi deve venire prima solubilizzata per potere entrare nell'interno della cellula batterica.

Ho studiato altresì la resistenza delle proteasi del *Mammococcus* G. \*) al calore. Mentre la proteinasi è subito distrutta completamente anche se mantenuta a 100° qualche secondo soltanto, la dipeptidasi, specialmente se di autolisati di recente preparazione, è molto più stabile e non viene completamente distrutta nemmeno dopo 20 minuti di ebullizione. Lo stesso avviene per un riscaldamento a 80°, anzi entro determinati limiti che stanno tra gli 80° ed i 100°, non è tanto la temperatura che ha influenza quanto il tempo durante il quale la soluzione dell'enzima vi è mantenuta. Nelle stesse condizioni l'erepsina della pancreatina provata come termine di confronto viene completamente distrutta dopo un minuto a 100°. La polipeptidasi è pure parzialmente resistente se di autolisati recenti, ma perde presto questa proprietà e con la conservazione finisce per comportarsi come la proteinasi e, se riscaldata a 100°, per venir subito distrutta. Del resto anche la normale attività polipeptidasica diminuisce grandemente e con celerità durante la conservazione degli autolisati che la contengono.

Le culture vengono fatte su latte scremato oppure su latte parzialmente digerito con l'1 % di pancreatina assoluta e dal quale è stata eliminata la caseina residua per acidificazione e la lattalbumina per ebullizione. Ambedue i terreni sono sterilizzati in autoclave a 120° per 20 minuti ed hanno un pH iniziale di 6,6—6,8.

Le culture vengono incubate a 37° e raggiungono gradatamente l'acidità massima di pH 4,8—4,6 dopo 4—6 giorni.

I filtrati sterili sono ottenuti centrifugando e filtrando sterilmente per SEITZ e portando a pH 7. La dialisi attraverso tubo di cellofane è protratta sino a scomparsa della reazione di MILLON. I corpi batterici, lavati in centrifuga con soluzione isotonica tamponata a pH 7, sono autolizzati con acqua saturata di toluolo tamponata a pH 7.

Le prove di digestione per la proteinasi sono state fatte su gelatina 8 %, per le peptidasi sui I-peptidi corrispondenti, l-leucilglicina e l-leucilglicilglicina. La glicil-l-leucina è molto meno attaccata della l-leucilglicina. La forma destrogira, come d'ordinario, non è attaccata. La determinazione della attività proteolitica è fatta per mezzo della titolazione in presenza di formolo, indicatore fenolfaleina, seguendo il metodo descritto dal NORTHROP 15).

### Proteinasi nel filtrato sterile di culture in latte

Enzima—Filtrato sterile di culture in latte incubate a 37° per tempi differenti — cc. 6.

Substrato—Gelatina 8 %—cc. 20.

Tampone—Citrato e fosfato.

pH delle prove di digestione: 6,5 — Durata: 24 ore a 40°.

culture incubate per	pH raggiunto dalle culture	cc. NaOH N/20
15 ore	5,10	1,40
20 "	5,00	1,20
24 "	4,90	0,96
72 "	4,65	0,11 solidif
4 giorni (con aggiunta di CaCO <sub>3</sub> )	5,20	1,60

La massima attività proteinasica si riscontra dopo 15/20 ore quando la cultura ha raggiunto un pH intorno a 5, quindi va scemando sino ad annullarsi. Però l'aggiunta di carbonato di calcio che non permette al pH di oltrepassare i 5, mantiene l'attività proteasica anche in filtrati da culture che sono state incubate a 37° per 4 giorni.

### Stabilità delle proteinasi ai differenti pH

Enzima—Filtrato sterile da culture in latte incubate a 37° per 20 ore (pH raggiunto 5,00) portato ai diversi pH subito dopo la filtrazione — cc. 6.

Le prove di digestione vennero istituite, le prime dopo 1 ora circa dalla preparazione e le altre dopo tempi determinati.

Substrato—Gelatina 8 %—cc. 20.

Tampone—Miscela di fosfati.

pH delle prove di digestione: 6,5—Durata: 24 ore a 40°

\*) C. GORINI 1, 2) aveva già nel 1892—94 dimostrato che la chimasi del *B. Prodigiosum* e di altri batteri acidoproteolitici resiste a 100° C. per oltre 15 minuti, dando il primo esempio di enzimi microbici coetoresistenti.

	ph della soluzione enzimatica						
	4,00	4,40	4,65	5,00	7,00	7,90	8,70
	(cc. di NaOH $\frac{N}{20}$ consumati)						
Prova di digestione dopo 1 ora ..	0,02 ×	1,00	1,07	1,15	1,20	1,20	1,10
„ „ „ „ 10 „ ..	0,00 ×	0,05 ×	0,90	1,15	1,16	1,18	1,12
„ „ „ „ 4 giorni	0,03 ×	0,00 ×	0,60	1,15	1,15	1,15	1,10
„ „ „ „ 20 „ ..	0,00 ×	0,03 ×	0,09 ×	0,95	1,05	1,02	0,95
„ „ „ „ 3 mesi .				0,30			

(le prove segnate con × sono solidificate per raffreddamento alla fine della prova stessa).

La proteinasi non è stabile in ambiente acido: a ph 4 è distrutta dopo 1 ora ed a ph 4,4 dopo 10 ore.

### Peptidasi nel filtrato sterile di culture in latte

Enzima: filtrato sterile dializzato da culture in latte incubate a 20° per tempi differenti. Cc. 6 per la proteinasi; cc. 3 per la dipeptidasi.

Substrato: gelatina 8 % per la proteinasi. *l*-leucilglicina gr. 0,00806 per la dipeptidasi. Da consumarsi teoricamente per una digestione completa: cc. 1 NaOH N/70

Tampone: acetato-Veronal.

Durata della digest.: 24 ore per la protein.; 8 giorni per la dipeptidasi.

ph delle prove; 6,5 per la protein.; 8,0 per la dipeptid.

Culture incubate per	ph raggiunto dalle culture	cc. NaOH N/20 Proteinasi	cc. NaOH N/70 Dipeptidasi
18 ore .....	5,90	0,76	0,66
30 „ .....	5,60	1,10	0,53
2 giorni .....	4,90	1,18	0,85
3 „ .....	4,60	0,63	0,92
5 „ .....	4,60	0,14 solid.	0,75
7 „ .....	4,60	0,05 „	0,25

Mentre la massima attività proteinasica si riscontra dopo 48 ore di incubazione a 20°, quella dipeptidasica è massima soltanto dopo 3 giorni quando già il ph raggiunto dalle culture è di 4,6 e dopo 7 giorni è ancora evidente mentre già è ridotta a 0 quella proteinasica.

Enzima: filtrato sterile da culture in latte incubate a 20° per tempi differenti. Cc. 6 per la Protein. Cc. 3 per la peptid.

Substrato: gelatina 8 % per la protein. Gr. 0,0121 *l*-leucilglicina per la dipeptid. Teorico cc. 1,5 NaOH N/70.

Tampone: acetato-Veronal

Durata della digestione: 24 ore.

ph delle prove: 6,2 per la protein. 7,8 per la dipeptid.

Culture incubate per	ph raggiunto dalle culture	cc. NaOH N/20 Proteinasi	cc. NaOH N/70 Dipeptidasi
17 ore .....	5,40	1,48	0,25
40 „ .....	4,90	1,28	0,34
40 „ .....	4,90	1,26	0,40
(ucciso con toluolo prima di centrif.)			
72 ore .....	4,60	0,05 solid.	0,30

Quando si uccide la cultura con toluolo prima di separare le cellule dal liquido culturale provocando l'autolisi delle stesse, l'attività proteinasica rimane invariata mentre aumenta invece quella della dipeptidasi.

Enzima: filtrato sterile da culture in latte, incubate a 20° per tempi differenti — cc. 3.

Substrato: *l*-leucilglicina gr. 0,0121 per prova. Da consumarsi teoricamente per una digest. completa: cc. 1,5 NaOH N/70.

Tampone: acetato-Veronal

ph delle prove: 8,0.

Culture incubate per	ph raggiunto dalle culture	cc. NaOH N/70			
		Non dializzato		Dializzato	
		dopo 1 giorno	dopo 8 giorni	dopo 1 giorno	dopo 8 giorni
20 ore.....	5,90	0,14	0,55	0,25	1,19
40 „.....	5,40	0,19	0,63	0,38	1,11
48 „.....	5,30	0,20	0,34	0,25	0,75

Il filtrato sterile dializzato è più attivo del non dializzato.

### Prove su latte digerito, proteasi dei corpi batterici

Enzima: culture su latte digerito incubate a 30° per tempi differenti.

Tampone: acetato—Veronal.

Durata della digestione: 24 ore.

Culture incubate per	ph raggiunto dalle cult	Non dializzato	Dializzato	Corpi batterici
gelatina 8 % — ph 6,50 — cc. NaOH N/20.				
24 ore.....	5,0	1,54	1,44	0,13 solid.
36 „.....	4,8	0,75	0,88	0,09 „
96 „.....	4,8	0,05 solid.	0,12 solid.	0,06 „
7 giorni .....	4,6	0,15 „		0,00 „
<i>l</i> -leucilglicina gr. 0,0121 — ph 7,8 — cc. NaOH N/70				
24 ore.....	5,0	0,10	0,09	1,22
36 „.....	4,8	0,14	0,20	1,27
96 „.....	4,8	0,02	0,00	1,15
7 giorni .....	4,6			1,02
<i>l</i> -leucilglicilglicina gr. 0,0157 — ph 7,8 — cc. NaOH N/70.				
24 ore.....	5,0			1,10
36 „.....	4,8			1,15
96 „.....	4,8			1,20
7 giorni .....	4,6			0,98

I corpi batterici non hanno attività proteinasica mentre presentano una attività peptidasica ingente. Mentre l'attività peptidasica dei corpi batterici rimane su per giù invariata, la proteinasi nel liquido culturale scompare con l'approssimarsi a 4,6 del ph della cultura stessa.

### Stabilità della dipeptidasi in ambiente acido

Enzima: 37 C autolisato dei corpi batterici di una cultura su latte digerito incubata a 30° per 4 giorni: ph raggiunto dalla cultura 4,80. ph della soluzione enzimatica 6,44. 40 C autolisato dei corpi batterici di una cultura su latte digerito incubata a 30° per 9 giorni. ph raggiunto dalla cultura 5,15. ph della soluzione enzimatica 6,65.

Substrato: gr. 0,0121 *L*-leucilglicina. Teorico cc. 1,5 NaOH N/70.

Tampone: acetato-Veronal.

Durata della digestione: ore 7 per il 37 C, ore 24 per il 40 C, ph delle prove: 7,8.

enzima a ph	enzima 37 C	enzima 40 C		
	mantenuto per 30' cc. NaOH N/70	mantenuto per 45' cc. NaOH N/70	mantenuto per 75' cc. NaOH N/70	mantenuto per 2 ore cc. NaOH N/70
tal. quale	1,41	1,50	1,50	1,40
6,00	1,35			
5,00	0,85			1,36
4,75		0,74	0,62	
4,50			0,41	0,55
4,00	0,45			
3,30		0,15		0,02

La dipeptidasi non è stabile in ambiente acido; essa è però più stabile della proteinasi.

### Resistenza al calore delle proteasi, attività su dipeptidi diversi

#### Dipeptidasi.

Enzima: IIB filtrato sterile dializzato di culture su latte incubate per 2 giorni a temp. ambiente. ph raggiunto: 5,05 ph della soluzione enzimatica 6,85. Usati cc. 3.

Substrato: gr. 0,0121 *L*-leucilglicina. Teorico cc. 1,5 NaOH N/70.

Tampone: acetato-Veronal.

Durata della digestione: 72 ore.

ph delle prove: 8,2.

tempo di riscaldamento	temperature			
	70° cc. NaOH N/70	80° cc. NaOH N/70	90° cc. NaOH N/70	100° cc. NaOH N/70
0'	0,81	0,83	0,70	0,70
30''	0,71	0,78	0,69	0,67
1'	0,74	0,74	0,70	0,53
3'	0,73	0,71	0,70	0,40
5'	0,65	0,69	0,65	0,28
7'	0,57	0,65	0,65	0,28
10'	0,50	0,65	0,56	0,25

A temperature comprese nei limiti delle prove, ed inferiori ai 100° ciò che conta soprattutto è la durata del riscaldamento.

Enzima: 34 C — 37 C — 40 C soluzioni dall'autolisi dei corpi batterici di culture su latte digerito. Usati cc. 1.

Substrato: gr. 0,0121 *L*-leucilglicina.

Tampone: acetato-Veronal.

Durata della digestione: ore 24 e ore 3.

ph delle prove: 7,8.

tempo di riscaldamento a 100°	enzima			
	34 C ore 3 cc. NaOH N/70	37 C ore 24 cc. NaOH N/70	40 C ore 24 cc. NaOH N/70	pancreatina ore 24—1,5 % cc. NaOH N/70
0	0,75	0,95	1,58	1,50
30''	0,35		0,65	0,10
3'		0,25	0,60	
5'		0,25	0,59	0,04
10'	0,23	0,23	0,49	0,00
20'	0,14		0,46	0,00
a 120' per 30'	0,00		0,05	

L'attività si riduce a zero soltanto se si riscalda in autoclave.

### Poliipeptidasi.

Enzima: 37 C—39 C autolisati dei corpi batterici di culture su latte digerito. Usati cc. I.

Substrato: gr. 0,0157 *l*-leucilglicilglicina.

Tampone: fosfato bisodico-acido citrico cc. 2.

Durata della digestione ore 24.

ph delle prove: 7,5.

bollito per minuti	39 C enzima fresco cc. NaOH N/70	37 C enzima di 15 giorni cc. NaOH N/70
0	1,10	1,13
5''	0,33	0,08
1'	0,34	0,05

La poliipeptidasi di soluzioni che non siano assolutamente recenti, viene completamente inattivata se portata a 100°.

### Proteinasi.

Similmente prove fatte su gelatina per la proteinasi, sono inattive quando la soluzione venga portata anche solo 1" all'ebullizione.

Enzima: IIB filtrato sterile dializzato da culture su latte incubate per 2 giorni a temp. ambiente. Usati cc. 3.

Substrato: gr. 0,0161 di dipeptide. Teorico cc. 2 NaOH N/70.

Tampone: acetato-Veronal.

ph delle prove: 8,0.

durata della digestione	glicil- <i>l</i> -leucina cc. NaOH N/70	<i>l</i> -leucilglicina cc. NaOH N/70	<i>d</i> -leucilglicina cc. NaOH N/70
1 giorno	0,33	1,45	0,08
2    "	0,68		
4    "	1,03		
6    "	1,18		
8    "	1,43		0,21

Occorrono 8 giorni per ottenere la digestione completa della glicil-*l*-leucina, mentre per la *l*-leucilglicina essa è già completa dopo 1 giorno nella presente prova, ma, in base alle prove precedentemente riferite, anche dopo 8 ore soltanto. La *d*-leucilglicina non è attaccata.

### Riassunto.

Breve esame bibliografico delle ricerche sul sistema proteasico dei batteri acido-proteoliti e ricerche originali sulla stabilità di dette proteasi all'acidità del mezzo ed al calore.

Mentre infatti è stata sufficientemente chiarita ogni questione riguardante la composizione qualitativa di detto sistema proteasico, non altrettanto chiaro risultava dallo esame delle ricerche sinora fatte, il meccanismo di produzione e di conservazione di tali proteasi in rapporto all' invecchiamento delle culture ed al conseguente incremento di acidità del mezzo.

Le proteinasi e peptidasi degli acidoproteoliti non sono stabili in ambiente acido ed al limite massimo di ph 4,5 raggiunto dalle culture, vengono rapidamente distrutte.

La diminuzione dell'attività proteasica delle culture incubate per parecchi giorni a 37° è da ascrivere a tale instabilità ed a essa soltanto.

Inoltre il biochimismo speciale degli acidoproteoliti permette di dimostrare incontrovertibilmente come, nel caso che ci riguarda, le proteinasi siano ecto- e le peptidasi endoenzimi. Infatti nei corpi batterici di culture anche vecchie si ritrovano le peptidasi e queste soltanto, mentre nel liquido culturale corrispondente che ha raggiunto un pH di 4,5, non si rivela praticamente più alcuna attività proteolitica nè proteinasica nè peptidasica.

Le proteinasi e polipeptidasi sono subito distrutte a 100°. Non così la dipeptidasi che nell'intervallo tra gli 80° ed i 100° richiede un riscaldamento di più di 20 minuti per venire distrutta completamente.

### Resumé.

Bref examen bibliographique des recherches sur le système protéasique des bactéries acidoprotéolytiques et recherches originelles sur la stabilité des protéases susdites à l'acidité du milieu et à la chaleur.

Si en effet toutes les questions qui regardent la composition qualitative du système susdit ont été suffisamment éclaircies, on ne peut en dire autant pour ce qui regarde le mécanisme de production et de conservation des dites protéases par rapport au vieillissement des cultures et à la conséquente augmentation de l'acidité du milieu.

Les protéases et peptidases des acidoprotéolytes ne sont pas stables dans le milieu acide et à la limite de pH 4,6, atteinte par les cultures, elles sont rapidement détruites. La diminution de l'activité protéasique des cultures incubées pendant plusieurs jours à 37° dépend exclusivement de la dite instabilité.

De plus le biochimisme particulier des acidoprotéolytes permet de démontrer d'une manière évidente dans le cas présent, que les protéinases sont des ecto- et les peptidases des endoenzymes. En effet dans les corps bactériens de cultures quoique vieilles on retrouve tout de même les péptidases et celle-ci seulement; au contraire dans le liquide culturel correspondant, qui a atteint le pH 4,5, on ne constate pratiquement plus aucune activité protéolytique ni protéasique ni péptidasique.

Les protéases et polypeptidases sont immédiatement détruites à 100°. Ceci n'est pas le cas pour les dipeptidases, qui entre 80° et 100° ne sont détruites que si le chauffage se prolonge pendant plus de 20 minutes.

### Zusammenfassung.

Kurzer Bericht über die bisherigen Forschungen betreffend das Proteasesystem der Acidoproteolyten, sowie neue Untersuchungen über die Stabilität dieser Proteasen gegen die Acidität der Umgebung und die Wärme.

Während nämlich alle die qualitative Zusammensetzung dieses Proteasesystems betreffenden Fragen schon genügend geklärt worden sind, ergibt sich aus den bisherigen Untersuchungen noch kein eindeutiges Bild über den Bildungs- und Erhaltungsmechanismus dieser Proteasen im Zusammenhang mit dem Altern der Kulturen und der daraus folgenden Zunahme der Acidität der Umgebung.

Die Proteinase und Peptidase der Acidoproteolyten sind in saurer Umgebung nicht stabil und werden, wenn die Kultur das pH 4,5 erreicht, rasch zerstört. Die Verminderung der Protease-Aktivität der einer mehrere Tage dauernden Inkubation bei 37° unterworfenen Kulturen hat ihre Ursache, und zwar ausschliesslich, in dieser Instabilität.

Der besondere Biochemismus der Acidoproteolyten liefert ausserdem den unumstösslichen Beweis, dass es sich im vorliegenden Fall bei den Proteinase um Ecto- und



bei den Peptidasen um Endoenzyme handelt. In den Bakterienkörpern von sogar schon alten Kulturen werden nämlich Peptidasen, und zwar nur diese, vorgefunden, während in der entsprechenden Kulturflüssigkeit, die den  $\text{ph}$ -Wert 4,5 erreicht hat, praktisch keine proteolytische, und zwar weder Proteinase- noch Peptidase-Aktivität festgestellt werden kann.

Die Proteinasen und Peptidasen werden bei  $100^\circ$  sofort zerstört. Das gilt nicht für die Dipeptidasen, deren Zerstörung in dem Temperaturbereich zwischen  $80^\circ$  und  $100^\circ$  eine Erhitzungsdauer von mehr als 20 Minuten erfordert.

### Summary.

A short bibliographical examination of the research on the proteasic system of the acidoproteolytic bacteria and personal research on the stability of the said proteases towards the acidity of the medium and towards heat.

All question regarding the qualitative composition of the said proteasic system has in fact been made sufficiently clear. From the result of the examination of the researches made up to this time, the mechanism of production and of preservation of the said proteases, in relation to the aging of the culture and the consequent increase of acidity in the medium, do not appear nearly so clear, however.

The proteinases and peptidases of the acidoproteolytes are not stable in an acid medium and when the culture reaches the maximum limit of  $\text{ph}$  4,5 they are rapidly destroyed. The decrease of proteasic activity of the cultures when incubated for several days at  $37^\circ \text{C}$ , is to be ascribed to this instability and to this only.

Besides, the particular biochemism of the acidoproteolytes permits to demonstrate without doubt how, in this particular case, the proteinases are ecto- and the peptidases are endoenzymes. In fact in the bacterial bodies, derived from cultures also aged, one finds the peptidases and there only, whilst in the corresponding cultural liquid, which has reached a  $\text{ph}$  of 4,5, one finds practically no more proteolytic activity, neither proteinasic nor peptidasic.

The proteinases and the polypeptidasen are immediately destroyed at a temperature of  $100^\circ \text{C}$ . Not so the dipeptidasen which require to be heated for more than twenty minutes between  $80^\circ$  and  $100^\circ \text{C}$  before being completely destroyed.

La proposta di sostituire l'appellativo „abituale" all'appellativo „costitutivo" per designare gli enzimi microbici che si manifestano sempre, indipendentemente dal substrato, è stata approvata da: ABDERHALDEN, ALBERS, BALLS, BAMANN, BERSIN, FREI, GORBACH, GRIMMER, HAEHN, HOOGERHEIDE, KARRER, KUHN, LINDERSTROM-LANG, MAZZA, R. NILSSON, OPPENHEIMER, W. H. PETERSON e M. J. JOHNSON, RONDINI, SCHOPFER, THEORELL, WALDSCHMIDT-LEITZ, WEIDENHAGEN, WILLSTÄTTER.

1) C. Gorini, Rivista Igiene e Sanità Pubbl. **3**, 527 (1892); **4**, 649 (1893); Hygien. Rdschau **3**, 381 (1893). — 2) C. Gorini, Giorn. R. Soc. It. Igiene **16**, 120 (1894). — 3) C. Gorini, Rend. R. Instit. Lomb. Sc. Lett. **84**, 1279 (1901); **87**, 939 (1904); **40**, 947 (1907); **41**, 117 (1908); **55**, 415 (1922); **56**, 994 (1923); **60**, 664 (1927); **61**, 551 (1928); **65**, 709 (1932); **67**, 787 (1934); Rend. R. Acc. Lincei **11**, 159 (1902); **19**, 150 (1910); **20**, 284 (1911); **21**, 790 (1912); **29**, 114 (1920); **35**, 629 (1926); Atti Pont. Acc. Sc. Nuovi Lincei **88**, 66 (1930); **86**, 48 (1933). — 4) C. Gorini, Rend. R. Acc. Lincei **11**, 159 (1902). — 5) C. Gorini, W. Grassmann, H. Schleich, Zs. physiol. Chem. **205**, 133 (1931). — 7) A. Janoschek, Milchwirtsch. Forsch. **11**, 330, (1931); Rend. X° Congresso mondiale del latte, Roma 1934, 11° Sez. N. 47. — 8) C. Gorini, L. Gorini, Rend. R. Ist. Lomb. Sc. Lett. **68**, 115 (1935). — 9) G. Gorbach, R. Ulm, Arch. für Mikrobiol. **6**, 362 (1935). — 10) G. Gorbach, Enzymol. **3**, 65 (1937). — 11) C. Gorini, Rend. R. Ist. Lomb. Sc. Lett. **78**, 475 (1940). — 12) E. Corberi, Archiv für Mikrobiologie, **9**, 95 (1938). — 13) W. Grassmann, confronta: Ergebn. d. Enzymf. **1**, 129 e segg. (1932). — 14) A. I. Virtanen, J. Tarnanen, Naturw. **19**, 397 (1931); Zs. physiol. Chem. **204**, 247 (1931). — 15) J. H. Northrop, J. of gen. Phys. **16**, 53 (1933).

# La cinétique de l' $\alpha$ -amylase du malt

PAR

G. HAMOIR

(Labor. de Biol. gén. de la Fac. des Sc. de l'Univ. de Liège)

Avec 5 Fig.

(1.VI.41.)

## Introduction.

La découverte de l' $\alpha$ -amylase du malt a été faite en 1930 par OHLSSON<sup>1)</sup>. Cet auteur a déterminé les conditions dans lesquelles il faut se placer pour l'isoler, ainsi que son ph optimum d'activité. Des mesures osmométriques lui ont en outre permis de montrer qu'il hydrolysait l'amidon en donnant lieu, comme les autres  $\alpha$ -amylases, à la formation d'une proportion importante de dextrines. Les travaux ultérieurs relatifs à l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -amylase du malt ont pleinement confirmé ces résultats<sup>(2-6)</sup>. L'étude de la cinétique de ce ferment n'a cependant pas encore été abordée directement.

Le travail que voici a pour but de déterminer l'influence de la concentration en amidon sur la vitesse d'hydrolyse et de rechercher s'il est possible de déceler une activation quelconque de ce ferment par le chlorure de sodium. Ces mesures impliquent le dosage de très faibles quantités de maltose en présence d'amidon et d'un tampon. Il fallait donc d'abord disposer d'une technique adaptée aux conditions particulières de nos recherches.

## I. Technique.

Les mesures de cinétique nécessitent la détermination des vitesses initiales d'hydrolyse et par conséquent le dosage de très faibles pouvoirs réducteurs (correspondant à quelques mgrs de maltose seulement). Notre choix était limité aux microméthodes de dosage des sucres dont les deux plus courantes sont la méthode de HAGEDORN-JENSEN et la méthode de SHAFFER et SOMOGYI. La première de ces méthodes a déjà été appliquée à l'étude de la cinétique de l'amylase du malt par HANES<sup>7)</sup>. Nous avons néanmoins préféré la méthode de SHAFFER et SOMOGYI qui nous paraissait plus commode. Elle n'a pas encore été appliquée à l'étude de la cinétique de ces ferments. Il nous a donc fallu tout d'abord adapter cette technique aux conditions de nos expériences.

**Application de la méthode de Shaffer et Somogyi au dosage du maltose en présence d'amidon.** La méthode a été décrite de façon détaillée par les auteurs<sup>(8-10)</sup>. Elle permet d'obtenir une précision de 1% dans le domaine de variation correspondant approximativement à nos mesures de cinétique (1 à 2,5 mgr glucose pour 5 cc de solution). Les dosages que nous aurons à faire ultérieurement ont nécessairement lieu en présence d'un tampon et d'amidon. En ce qui concerne le tampon, on a choisi des conditions telles que le ph ne diffère guère du ph optimum du ferment et que la solution soit suffisamment tamponnée: on a utilisé un mélange de phosphates mono- et disodique de concentration 0,03 molaire et de ph 6,1. La concentration de l'amidon était de 1%. On peut négliger la diminution de concentration due au commencement de l'hydrolyse (qui est de l'ordre de quelques % seulement).

Nous avons d'abord déterminé le temps de chauffage nécessaire dans ces conditions pour que la réduction soit pratiquement complète; nous avons ensuite analysé l'influence sur l'équivalent de réduction  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose de l'addition d'amidon soluble de ZULKOWSKY avec et sans tampon.

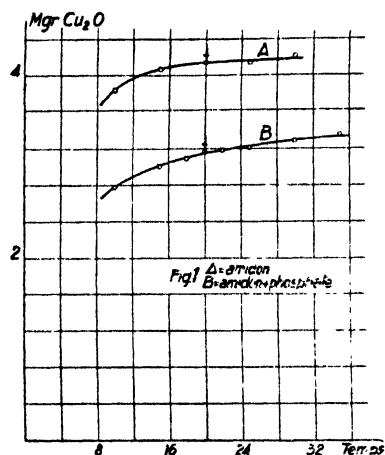


Fig. 1. Détermination du temps de chauffage optimum au bain-marie: variation de la quantité d'oxyde cuivreux formé en fonction du temps de chauffage en présence d'amidon soluble MERCK à la concentration de 1% (courbe A) et d'un mélange d'amidon soluble de ZULKOWSKY à la concentration de 1% et de phosphate 0,03 molaire de ph 6,1 (courbe B).

a. **Détermination du temps de chauffage optimum au bain-marie.** Les recherches de SHAFFER et SOMOGYI<sup>10)</sup> ont montré que le maltose occupe une position intermédiaire entre les sucres facilement oxydables (fructose, glucose) et ceux qui le sont plus difficilement (lactose, mannose). Nous avons par conséquent utilisé le réactif proposé par ces auteurs pour les sucres s'oxydant lentement \*). On ajoute à 5 cc de ce réactif une solution de maltose de concentration convenable. Les tubes renfermant ces solutions sont placés au bain-marie pendant des temps variables. Le dosage de la quantité d'oxyde cuivreux formé permet de tracer la courbe donnant la variation de la réduction en fonction du temps et de déterminer ainsi le temps de chauffage optimum.

Ces expériences ont été faites: a) en présence d'amidon soluble MERCK à la concentration de 1%; b) en présence d'amidon soluble de ZULKOWSKY à la concentration de 1% et de tampon phosphatique 0,03 moléculaire et de ph 6,1. Nous avons obtenu les résultats mentionnés dans le tableau I.

En l'absence de tampon, la courbe qui indique la quantité de  $\text{Cu}_2\text{O}$  formé en fonction du temps (fig. 1) présente un palier assez marqué commençant à partir d'un temps de chauffage de 20 minutes environ. En présence de tampon, la courbe continue à monter lentement

TABLEAU I.  
Détermination du temps de chauffage optimum.

I. Amidon soluble MERCK (1 %)				II. Amidon soluble ZULKOWSKY (1 %) et tampon phosphatique 0,03 mol. et de ph 6,1			
Temps de chauffage en minutes	CCS $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,005 n utilisés	CCS Iode 0,005 n fixés	$\text{QCu}_2\text{O}$	Temps de chauffage en minutes	CCS $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,005 n utilisés	CCS Iode 0,005 n fixés	$\text{QCu}_2\text{O}$
0	25	0	0	0	24,75	0	0
10	14,25	10,75	3,84	10	17	7,75	2,77
15	13,6	11,4	4,07	15	16,35	8,4	3
20	13,4	11,6	4,14	18	16,1	8,65	3,09
25	13,4	11,6	4,14	20	15,9	8,85	3,16
30	13,2	11,8	4,21	22	15,85	8,9	3,18
				25	15,75	9	3,21
				30	15,55	9,20	3,28
				35	15,35	9,40	3,35

\*) Sa formule est la suivante:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anhydre 40 gr par litre  
 Tartrate sodico-potassique 25 " " "  
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  7,5 " " "  
 $\text{KIO}_3$  0,1 n/l 250 cc " "  
 KI 5 gr " "

même lorsqu'on prolonge le temps de chauffage jusqu'à 35 minutes. Ceci est en conformité avec les résultats de SHAFER et SOMOGYI d'après lesquels une diminution d'alcalinité du réactif ralentit l'oxydation des sucres. L'inclinaison est relativement faible et à peu près constante à partir de 20 minutes. Nous avons par conséquent décidé de choisir le même temps de chauffage dans les deux cas, soit 20 minutes.

**b. Influence de la présence d'amidon sur l'équivalent de réduction  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose.** L'amidon peut influencer le dosage du maltose de deux manières différentes: a) en fixant l'iode libéré lors de l'acidification du réactif, b) en modifiant l'équivalent de réduction  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose.

(a) La fixation d'iode par l'amidon est sans influence sur le dosage. Nous avons affaire à un phénomène d'adsorption parfaitement réversible pour autant que l'amidon ne reste pas plus d'une heure en présence de la solution d'iode. On observe en effet que la netteté du terme ne se trouve pas modifiée <sup>(11)</sup>.

La diminution correspondante de concentration en iode n'influence pas non plus la réoxydation de l'oxyde cuivreux: les résultats obtenus, en se conformant aux indications de SHAFER et SOMOGYI, se sont montrés assez constants.

(b) On sait d'autre part que des substances ne jouant aucun rôle au cours de la réduction sont néanmoins susceptibles de modifier l'équivalent de réduction  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose. C'est par exemple le cas de l'oxalate de soude dont la présence pendant le chauffage diminue la réduction <sup>(10)</sup>.

Nous avons déterminé les courbes  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose correspondant au maltose pur et au maltose en présence d'amidon soluble de ZULKOWSKY. L'addition de thymol évitait toute altération de ces solutions par les moisissures. Nous avons obtenu les valeurs suivantes: (Tableau II).

Ces différentes valeurs se répartissent suivant deux droites partant approximativement du même point d'origine et présentant des coefficients angulaires de 1,34 (maltose pur, fig. 2, A) et de 1,40 (maltose en présence d'amidon, fig. 2, B). L'amidon soluble de ZULKOWSKY a donc pour effet d'augmenter l'équivalent de réduction  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose. Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux obtenus par HANES dans des conditions analogues avec la méthode de HAGEDORN-JENSEN <sup>7)</sup>. Cet auteur n'avait pas observé d'influence de l'amidon. Il semble donc préférable, pour des recherches ultérieures, de recourir à la technique que HANES a proposée. Nous n'avons cependant pas cru devoir l'utiliser. Il nous suffisait en effet pour nos expériences d'activation, qui constituent le but principal de ce travail, de déterminer une fois pour toutes la valeur de l'équivalent de réduction correspondant aux conditions d'hydrolyse.

**c. Détermination de la courbe  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose**

TABLEAU II.

Quantités de  $\text{Cu}_2\text{O}$  formées en fonction de la concentration en maltose avec et sans amidon de ZULKOWSKY.

Maltose pur		Maltose en présence d'amidon soluble de ZULKOWSKY à la concentration de 1 %	
mgr $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	mgr $\text{Cu}_2\text{O}$	mgr $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	mgr $\text{Cu}_2\text{O}$
0,7	0,8	0,583	0,705
1,4	1,68	0,875	1,1
2,33	2,88	1,166	1,51
			1,47
2,8	3,58	1,75	2,24
	3,54		
3,5	4,49	2,33	3,04
	4,44	2,625	3,475
		3,5	4,685

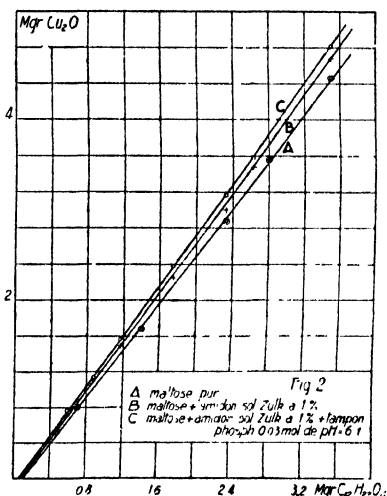


Fig. 2. Détermination de l'équivalent de réduction  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose de différentes solutions de maltose.

dans les conditions des expériences ultérieures d'hydrolyse (en présence d'amidon de ZULKOWSKY à la concentration de 1% et de tampon phosphatique 0,08 m et de ph 6,1).

On observe, en présence de tampon, une augmentation de l'équivalent de réduction que les recherches de SHAFFER et SOMOGYI permettaient d'ailleurs de prévoir: ces auteurs ont en effet montré qu'une diminution d'alcalinité du réactif augmente l'équivalent de réduction. Nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau III).

Ces résultats, traduits en courbe (fig. 2, C), permettent de doser des quantités de maltose allant de 0,2 à 3,5 mgr dans des conditions de concentration en amidon, en tampon et de ph correspondants aux mesures ultérieures de cinétique. La variation est également linéaire. C'est cette courbe qui servira de base aux déterminations effectuées dans la deuxième partie de ce travail.

TABLEAU III.

Quantités de  $\text{Cu}_2\text{O}$  formées en fonction de la concentration en maltose avec amidon de ZULKOWSKY, en présence de tampon phosphatique.

mgr Maltose	mgr $\text{Cu}_2\text{O}$
0,583	0,765
0,875	1,14
1,166	1,57
1,75	2,38
2,33	3,17
2,625	3,58
3,5	4,81

## II. La cinétique de l' $\alpha$ -amylase du malt.

### a. Influence de la concentration en substrat sur la vitesse initiale d'hydrolyse.

Les résultats que nous avons obtenus à ce sujet ne sont valables qu'en première approximation. Ils sont en effet tous rapportés à une même courbe de réduction (correspondant à la concentration de 1% en amidon) alors que l'influence de l'amidon sur l'équivalent  $\text{Cu}_2\text{O}$ /maltose nécessiterait la détermination d'une série de courbes correspondant aux différentes concentrations en amidon que l'on se propose d'étudier (voir plus haut). Nous avons cependant cru utile de les publier parce qu'ils permettent du moins de tirer quelques conclusions d'ordre qualitatif intéressantes.

Le ferment était préparé à partir de la „*Diastase toute pure*” MERCK. On pèse exactement 0,8 gr que l'on dissout dans un mortier; on filtre à la trompe et étend à 100 cc. L'élimination de la  $\beta$ -amylase se fait par chauffage suivant le mode opératoire décrit par OHLSSON<sup>1</sup>). Nous nous sommes assurés, par des mesures polarimétriques, que le ferment que nous avons ainsi préparé, était bien de l' $\alpha$ -amylase. Il peut être conservé très longtemps à la glacière en présence de thymol sans perdre de son activité.

Les expériences d'hydrolyse sont faites en présence de tampon phosphatique de concentration 0,08 molaire et de ph 6,1. La température du thermostat est de 35° C ( $\pm 0,1^\circ$ ).

Nous avons obtenu les résultats suivants (Tableau IV).

TABLEAU IV.

Influence de la concentration en amidon sur la vitesse d'hydrolyse.

Conc. en amidon en %	Temps en minutes	mgr Maltose	Temps en minutes	mgr Maltose	Moyenne	
					Temps en minutes	mgr Maltose
0,125	5	0,13	5	0,10	5	0,11
	11	0,14	10	0,23	11	0,18
	17	0,25	15	0,22	15	0,22
			20	0,30	17	0,25
			25	0,35	20	0,30
					25	0,35
0,25	6	0,20				
	12	0,27				
	24	0,38				

TABLEAU IV (suite).

Conc. en amidon en %	Temps en minutes	mgr Maltose	Temps en minutes	mgr Maltose	Moyenne	
					Temps en minutes	mgr Maltose
0,5	15	0,36	15	0,38	15	0,37
	30	0,70	30	0,63	30	0,66
	45	0,88	45	0,92	45	0,90
1	15	0,48				
	30	0,84				
	45	1,31				
2	15	0,66				
	28	1,05				
3,2	10	0,42				
	20	0,80				
	25	0,97				
5	6	0,30				
	15	0,58				
	20	0,68				

Ces valeurs permettent de tracer la courbe d'activité du ferment en fonction de la concentration en amidon (fig. 3). Nous avons mis en ordonnée la quantité de maltose formée après 15 minutes.

Cette courbe n'est valable, comme nous l'avons vu, qu'en première approximation (mesure

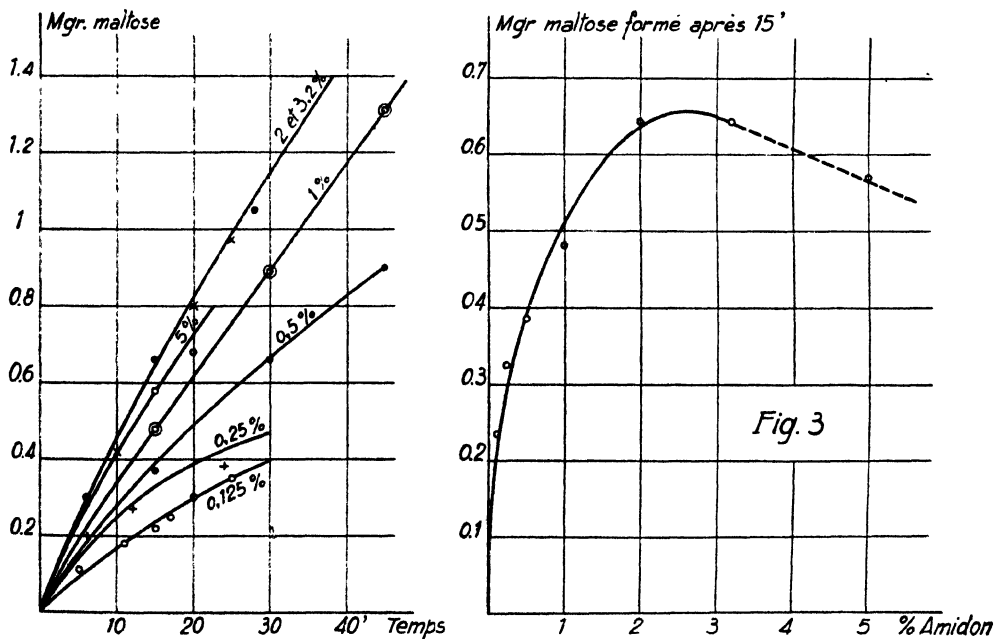


Fig. 3. Courbe d'activité du ferment en fonction de la concentration en amidon. Les courbes de gauche indiquent les quantités de maltose formées en fonction du temps pour différentes concentrations en amidon. La courbe de droite donne la variation de la quantité de maltose formée après 15 minutes en fonction de la concentration en amidon.

approchée de la vitesse initiale, influence de l'amidon sur l'équivalent de réduction). Elle nous permet néanmoins de faire les constatations suivantes:

La première partie de la courbe correspond approximativement à la branche d'hyperbole équilatère que prévoit la théorie de MICHAELIS; la valeur de  $K_s$  est de 0,3 à 0,4% alors que HANES avait obtenu 0,077% pour le mélange de l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -amylase du malt (12). La vitesse d'hydrolyse est maxima pour une concentration d'environ 2,5% et décroît ensuite lentement avec la concentration. L'existence de ce maximum est très probablement dû à la diminution de la concentration en eau. NELSON et SCHUBERT (13) ont en effet montré que la saccharase présente le même phénomène pour une concentration en sucre de 5% et qu'il est dû, dans ce cas, à la diminution de la concentration en eau.

**b. Action du chlorure de sodium sur l'activité du ferment.** L' $\alpha$ -amylase du malt ne forme pas seulement le même sucre que les autres  $\alpha$ -amylases; elle donne aussi lieu, au cours de l'hydrolyse, à la formation d'une proportion importante de dextrines. Cette analogie de comportement nous a poussé à rechercher s'il n'était pas également possible de déceler une activation quelconque de ce ferment par le chlorure de sodium.

MYRBÄCK (14) a montré que les concentrations en ions chlore nécessaires pour activer l'amylase salivaire sont de l'ordre de  $10^{-3}$  ion-gramme/l, la concentration optimum étant de 1 gr/l. Comme nos solutions d'amidon et de ferment ne contenaient pas même de chlore décelable par le nitrate d'argent, nous avons d'abord vérifié si l'addition de chlorure de sodium à la concentration optimum d'activation de l'amylase salivaire ne modifiait pas la vitesse d'hydrolyse. Nous n'avons observé aucune influence. Ces résultats n'excluaient pas la possibilité d'une activation du ferment par de très faibles concentrations en chlore. C'est pourquoi nous avons dialysé nos solutions de façon à obtenir une élimination aussi complète que possible des sels qu'elles contenaient.

**Dialyse de l'amidon.** — L'électrodialyse paraissait tout indiquée. L'appareil dont nous disposions est celui de MANEGOLD (15), mais l'emploi de cette technique présente certaines difficultés dans le cas de l'amidon: il se produit un appel d'eau important (pression osmotique élevée et électro-osmose) qui oblige à rendre ce compartiment hermétique et rend plus difficile l'homogénéisation de la solution par agitation. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes bornés à dialyser l'amidon dans des sacs en collodion: ceux-ci sont fixés par une bague de caoutchouc sur des bouchons en liège paraffinés et percés d'un trou permettant le passage d'un tube de verre (pour le remplissage et la vidange); ils sont placés sur un support animé d'un mouvement de va et vient dans le sens vertical, ce qui assure une diffusion plus rapide des sels. On maintient une concentration suffisante d'antiseptique dans la solution d'amidon en ajoutant de temps en temps quelques gouttes de thymol. On suit l'avancement de la dialyse par des mesures de conductivité. La fréquence du courant utilisé est de 1000 périodes par seconde. Un amplificateur intercalé entre le pont et l'écouteur permet d'obtenir une plus grande précision. La résistivité de la solution d'amidon de ZULKOWSKY à 4% est passée de 350 à 35.000 ohms après cinq jours de dialyse; une autre expérience poursuivie pendant vingt jours nous a donné la même résistivité finale (36.000 ohms). La faible conductivité que ces solutions conservent est probablement due à certains constituants ionisables de la partie non glucidique de l'amidon.

**Dialyse du ferment.** — Les solutions de ferment ne présentent pas à l'électrodialyse l'inconvénient constaté dans le cas de l'amidon, même pour des concentrations élevées (12 gr/l). Par contre, les variations de pH produites par le passage du courant (perméabilité différente des ultrafiltres aux anions et aux cations) doivent être fréquemment compensées de façon à éviter autant que possible l'altération du ferment.

Décrivons rapidement le montage utilisé.

La séparation des différents compartiments de l'appareil de MANEGOLD est assurée par des ultrafiltres de ZSIGMONDY, fournis par la „Membranfilter Gesellschaft" de Göttingen (Ultrafeinfilter fein de perméabilité  $Z = 30-40$ ). Les pertes que l'on observe en ultrafiltrant une solution de ferment à travers une membrane de cette perméabilité sont de l'ordre de 6%. Les membranes moins perméables conviennent cependant moins bien: elles offrent une trop grande résistance au passage du courant. Le courant continu est fourni par un redresseur branché sur le réseau alternatif de 110 volts et possédant un système d'uniformisation du courant con-

stitué de deux cellules self-capacité qui éliminent pratiquement toute composante alternative. La différence de potentiel aux bornes est de 400 volts pour un débit de 5 mA et de 270 volts pour 50 mA. Une résistance placée en série, du type „Resistograd Pilot”, permet de régler l'intensité du courant. Un milliampèremètre intercalé dans le circuit donne l'intensité du courant traversant la solution à dialyser. Enfin, un interrupteur coupe le courant et court-circuite en même temps l'appareil à électrodialyse pour les mesures électrométriques de ph.

L'ouverture du compartiment central contenant la solution de ferment est trop petite pour permettre l'introduction d'un agitateur et d'une électrode destinée à mesurer le ph de la solution. Nous avons tourné cette difficulté en utilisant l'appareil représenté dans la figure 4 (A). On amorce l'appareil en introduisant un peu de solution de ferment dans le godet et on le relie à une trompe à eau. On comprime progressivement le caoutchouc par lequel se fait l'arrivée d'air par la vis de réglage, jusqu'à ce que la dépression obtenue dans l'appareil soit suffisante pour entraîner le liquide. La chaux sodée sert à éliminer le  $\text{CO}_2$ . La dépression que l'on doit réaliser n'est que de quelques cms d'eau. Lorsqu'on relie directement l'appareil à la trompe, on est obligé d'en réduire fortement le débit. Il en résulte une aspiration assez irrégulière qui nécessite des modifications fréquentes du réglage de l'appareil. Une amélioration considérable a été obtenue en plaçant sur le trajet de la canalisation allant à la trompe un flacon d'une contenance d'une dizaine de litres et surtout un capillaire de diamètre convenable, (figure 4B). Cela permet de faire fonctionner la trompe à eau à plein rendement et de rendre l'agitation parfaitement automatique. On ajoute quelques gouttes d'alcool octylique à la solution de ferment de façon à l'empêcher de mousser. Le godet se trouvant dans le circuit du liquide permet de faire les prélèvements nécessaires pour la mesure de la conductivité de la solution, de déterminer la température du ferment et de faire les mesures de ph.

**Mesures de ph.** Une électrode de verre du type MAC INNES <sup>16</sup>) est introduite dans la solution au moment de la mesure; elle est

remplie d' $\text{HCl}$  n/10. L'électrode de jonction est remplie d'une solution de chlorure de sodium 0,1 n. Dans chacune de ces électrodes plonge un fil de platine argenté et chloruré selon la méthode de BROWN <sup>17</sup>). L'étalonnage de l'électrode de verre est faite par la mesure du potentiel d'un certain nombre de solutions tampons dont le ph a été au préalable déterminé par l'électrode de  $\text{Pt}/\text{H}_2$ . La mesure de la différence de potentiel aux bornes des électrodes est effectuée par un électromètre à deux lampes mises en parallèle <sup>18</sup>)

**Résultats.** — Les premières électrodialyses que nous avons réalisées ont été faites à la température du laboratoire. L'ampérage était réglé initialement à 100 mA environ et baissait progressivement au cours de l'expérience jusqu'à 20 mA environ. On corrigeait le ph de 10 en 10 minutes environ par addition de soude 0,1 n dans le compartiment central. Les solutions de ferment électrodialysées dans ces conditions se sont révélées entièrement inactives. Nous avons alors travaillé à température plus basse. L'eau servant au lavage des compartiments anodique et cathodique était préalablement portée à 0° C. La température de la solution de ferment est d'autant plus basse que le débit est rapide. Celui-ci a par contre l'inconvénient de diminuer la vitesse de dialyse en provoquant une chute de potentiel trop forte près des électrodes. En

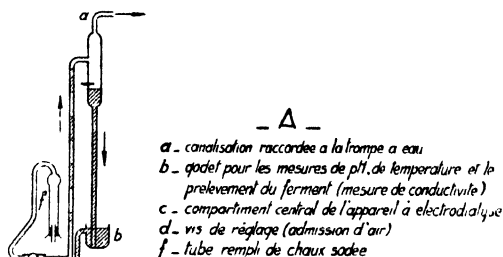
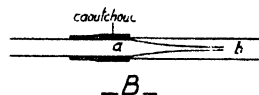


Fig 4



a - pression légèrement plus faible que la pression atmosphérique  
b - pression du 14 mm de Hg

Fig. 4. A, schéma de l'appareil servant à agiter la solution de ferment et à permettre d'en mesurer le ph. Le sens du mouvement du liquide et de l'air est indiqué par les flèches. B, capillaire intercalé entre l'appareil représenté en A et la trompe à eau de façon à régulariser le mouvement du liquide.



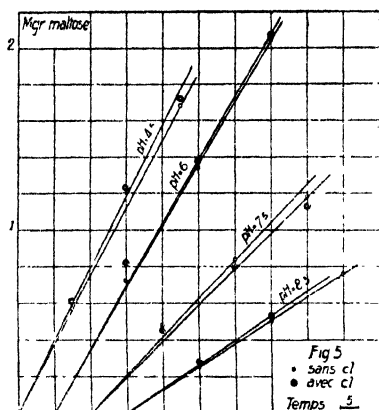


Fig. 5. Influence du chlorure de sodium à la concentration de 1 gr/litre sur l'activité du ferment à différents ph. Ces courbes ont été décalées de 10 minutes l'une par rapport à l'autre de façon à rendre le graphique plus lisible.

Nous avons obtenu les résultats mentionnés dans le tableau V (figure 5).

TABLEAU V.

Action de NaCl à la concentration de 1 gr/l sur l'activité du ferment.

ph 4,5			ph 6		
Temps en minutes	mgr Maltose		Temps en minutes	mgr Maltose	
	sans Cl	avec Cl		sans Cl	avec Cl
15	0,57	0,61	20	0,72	0,82
30	—	1,23	40	1,34	1,38
45	1,68	1,72	60	2,04	2,07
ph 7,5			ph 8,3		
Temps en minutes	mgr Maltose		Temps en minutes	mgr Maltose	
	sans Cl	avec Cl		sans Cl	avec Cl
20	0,48	0,45	20	0,26	0,28
40	0,84	0,80	40	0,50	0,53
60	1,18	1,13	60	0,76	—

Comme on le voit, il n'y a aucune activation quel que soit le ph. Il faut donc très probablement distinguer deux groupes d' $\alpha$ -amylases: les  $\alpha$ -amylases animales activables par les sels et les  $\alpha$ -amylases végétales non activables. Ce second groupe comprendrait l' $\alpha$ -amylase du malt et l'amylase extraite de l'*Aspergillus oryzae* dont l'activation ne serait pas non plus influencée par les sels (<sup>19</sup>). Une telle classification ne peut évidemment être que provisoire. Des considérations de spécificité, basées sur une meilleure connaissance de la constitution chimique des polysaccharides, pourront seules apporter une solution définitive à ce problème.

## Résumé.

Ce travail comprend deux parties.

La première traite de l'application de la microméthode de dosage des sucres de SHAFER et SOMOGYI au dosage du maltose en présence d'amidon. La vitesse avec laquelle la réduction du réactif au bain-marie a lieu dépend de la nature du sucre et de la composition du réactif. Nous avons déterminé le temps optimum de réduction correspondant au maltose. Nous avons étudié l'influence de la présence d'amidon sur l'équivalent de réduction  $\text{Cu}_2\text{O}/\text{maltose}$ . Nous avons fait ensuite une série de dosages permettant d'établir la courbe donnant la quantité d'oxyde cuivreux formé en fonction de la quantité de maltose dans les conditions correspondant aux expériences d'hydrolyses ultérieures.

La seconde partie est relative à la cinétique de l' $\alpha$ -amylase du malt. Nous l'avons étudiée au point de vue de l'influence de la concentration en amidon et de l'action du chlorure de sodium sur l'activité du ferment. La courbe obtenue dans l'étude de l'influence de la concentration en amidon sur la vitesse d'hydrolyse croît d'abord approximativement suivant l'équation de MICHAELIS; elle passe par un maximum pour une concentration en amidon de 2,5% et décroît ensuite lentement. Nous avons d'autre part éliminé les sels contenus dans les solutions d'amidon et de ferment de façon aussi complète que possible. Des mesures de conductivité permettaient de suivre constamment la dialyse de l'amidon et l'électrodialyse du ferment. Les hydrolyses réalisées à partir de ces solutions en milieu phosphatique (tampon) ont montré que la présence de chlorure de sodium à la concentration d'un gr/l ne modifiait pas l'activité du ferment.

1) E. Ohlsson, Zs. physiol. Chem. **189**, 17 (1930). — 2) O. Edfeldt, G. Nordh, T. Swaetichin, Bioch. Zs. **223**, 478 (1930). — 3) E. Waldschmidt-Leitz, M. Reichel, A. Purr, Naturwiss. **20**, 254 (1932). — 4) K. V. Giri, Current Science **2**, 128—129 (1933). — 5) M. L. Caldwell, S. E. Doebbeling, Jl. of Biol. Chem. **110**, 739 (1935). — 6) J. Blom, A. Bak, Ben Braae, Zs. physiol. Chem. **250**, 104 (1937). — 7) Ch. S. Hanes, Biochem. Jl. **23**, 99 (1929). — 8) Ph. A. Shaffer, A. F. Hartmann, Jl. of Biol. Chem. **45**, 349 (1920—21). — 9) M. Somogyi, ibid. **70**, 599 (1926). — 10) Ph. A. Shaffer, M. Somogyi, ibid. **100**, 695 (1933). — 11) P. Karrer, Polymere Kohlenhydrate, Akadem. Verlagsgesellsch. Leipzig 1925, p. 29. — 12) Ch. S. Hanes, Biochem. Jl. **26**, 1406 (1932). — 13) J. M. Nelson, M. P. Schubert, Jl. Amer. Chem. Soc. **50**, 2188 (1928). — 14) K. Myrbäck, Zs. physiol. Chem. **159**, 1 (1926). — 15) E. Mane-gold, Kolloid Zs. **78**, 129 (1937). — 16) D. A. Mac Innes, D. Belcher, Jl. Amer. Chem. Soc. **53**, 3315 (1931). — 17) A. S. Brown, Jl. Amer. Chem. Soc. **56**, 646 (1934). — 18) M. Dubuisson, A. Debot, Arch. intern. Physiol. **50**, 1 (1940). — 19) J. B. S. Haldane, Allgemeine Chemie der Enzyme, Steinkopff, Dresden und Leipzig, 1932, p. 208.

## Some further experiments on the inhibition of "top-yeast phosphatase" by aneurin

BY

H. G. K. WESTENBRINK AND D. A. VAN DORP

(Labor. of physiol. Chem., Univ., Amsterdam)

(23.VI.41.)

In a previous paper <sup>(1)</sup> we have demonstrated that the decomposition of aneurin-pyrophosphate (APP) by top-yeast phosphatase is strongly inhibited by aneurin and to a lesser degree by the pyrimidine-half of the aneurin molecule (2-methyl-4-aminopyrimidyl-5-methylaminodihydrochloride, which we will further abridge to „pyrimidyl"). Up to this observation no powerful inhibitors of phosphatases were known. In 1936 OPPENHEIMER <sup>2)</sup> has given a survey of the inhibitors of the phosphatases. Many conflicting observations were reported. In some cases arsenate and moniodoacetate seem to induce a slight inhibition; HCN is without any influence \*). „Die Phosphate hemmen nach Übereinstimmung aller Autoren." „Besonders starke Hemmung üben Borate aus, was bei Boratpuffer zu beachten ist". Concerning organic inhibitors, OPPENHEIMER writes: „Die als Spaltprodukte auftretenden Stoffe, so Glycerol, scheinen im allgemeinen keine Wirkung zu haben." „Eiweissabbaustoffe hemmen stark, Glycin (in Puffergemischen) bis 30 %." Compared to all these statements the inhibitory action of aneurin seemed to be exceptionally strong and worthy of further investigation.

As aneurin is one of the reaction-products of the decomposition of APP by the phosphatase it was obvious that its inhibitory effect was a case of competitive inhibition. Hence it would be interesting to determine the affinity of the phosphatase towards APP, other substrates and aneurin and the other structurally related inhibitors. It seemed possible that the affinity of the phosphatase towards APP and aneurin was relatively low, much lower than the affinities towards  $\alpha$ -glycerophosphate,  $\beta$ -glycerophosphate, inorganic pyrophosphate etc., substrates commonly used in phosphatase studies, and that therefore one could only expect to observe the inhibitory action of aneurin on the phosphatase with APP as a substrate. But it seemed equally possible that the affinity of APP and aneurin towards the phosphatase was so great that aneurin would appear to be a powerful inhibitor of the action of this phosphatase in general.

We have encountered many experimental difficulties in this work by which we became aware that it will not be an easy task to determine these affinity constants with reasonable accuracy. Provisionally personal circumstances will render it impossible for us to carry out these measurements, so that we wish to record our preliminary results, showing that not only the decomposition of APP but also that of the other substrates is inhibited by aneurin. Even the decomposition of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glycerophosphate appeared to be inhibited by smaller aneurin concentrations in ratio to the substrate concentrations than the decomposition of APP. So aneurin seems to be a general and very effective inhibitor of „top-yeast phosphatase". However, in the mean time it has been shown by the first of the present authors together with Miss E. P. STEYN PARVÉ and J. GOUDSMIT (unpublished) that it is not an inhibitor of phosphatases in general: various tissue phosphatases, e.g. the phosphatases from kidney and intestinal mucosa, when acting on APP are not inhibited by aneurin even with a molecular ratio aneurin/APP = 300. As we will demonstrate below an inhibition of about 50% is observed with the „top-yeast phosphatase" and a molecular ratio aneurin/substrate = 0.4 when  $\alpha$ - or  $\beta$ -glycerophosphate is the substrate, and a molecular ratio aneurin/APP = 7.5, when APP is the substrate.

\*) Lateron CLOETENS <sup>3)</sup> reported the inhibition of an „alkaline" animal phosphatase by HCN.

### Experimental part.

The English bakers' yeast mentioned in our previous communications (1) was employed throughout our work.

The decomposition of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glycerophosphate was studied in the common way by determining the amounts of orthophosphoric acid liberated. These determinations were performed with the method of FISKE and SUBBAROW.

In the beginning of our experiments the reaction-mixtures were deproteinized by trichloroacetic acid. However, the addition of molybdic acid to the deproteinized filtrate often caused a light blue, almost white precipitate. This slight blue tint was obviously caused by reducing substances, present in the alkaline washed yeast and reacting with the phosphomolybdic acid formed. If the precipitate was not removed before adding the reducing agent it was coloured deep-blue. But also when it was removed another precipitate was often formed during the development of the blue colour. Hence we were compelled to use another method of removing the proteins. We tried several methods; SCHENCK's method (HCl and  $\text{HgCl}_2$ ) appeared to be the most adequate one, though the experiments became much more cumbersome by working in this way.

However, a complication arising from the simultaneous presence of aneurin, phosphate and molybdate in our reaction-mixtures, remained. It is known since many years that aneurin is precipitated by phosphomolybdic acid, but we had not expected this fact to affect the phosphate determination with FISKE and SUBBAROW's method seriously, since the phosphate concentrations occurring in this method are so extremely small. With a constant molybdic acid concentration the phosphate concentration, at which the precipitate is formed, depends upon the aneurin concentration and conversely. The following example may be given:

5 cm<sup>3</sup> of a suspension of alkaline washed yeast in citrate buffer were incubated for 1 hour at 27.5° C with 5.4 mg of  $\beta$ -glycerophosphate (dissolved in 4 cm<sup>3</sup> of citrate buffer) and 13.4 mg of aneurin (dissolved in 1 cm<sup>3</sup> of citrate buffer). The pH of the reaction mixture was 3.7. We are able to estimate that about 50  $\gamma$  of inorganic phosphate-P will have been set free. 2 cm<sup>3</sup> of the mixture were pipetted into 4 cm<sup>3</sup> of 4 % HCl and 4 cm<sup>3</sup> of saturated  $\text{HgCl}_2$ . The precipitate was removed by centrifuging and filtering, Hg was precipitated in the filtrate by  $\text{H}_2\text{S}$ . Then we centrifuged and filtered again and the filtrate was freed from  $\text{H}_2\text{S}$  by leading through a stream of moist air. To 5 cm<sup>3</sup> of the clear filtrate, containing 1.34 mg of aneurin and about 5  $\gamma$  of orthophosphate-P, 1 cm<sup>3</sup> of molybdate solution and 4 cm<sup>3</sup> of water were added. A white crystalline precipitate was formed immediately.

With larger amounts of aneurin amounts of P, still smaller than 5  $\gamma$ , were sufficient to give the precipitate. The precipitate was not observed when the  $\beta$ -glycerophosphate or aneurin were omitted from the reaction mixture.

From these and similar observations we came to know the largest amount of aneurin, which might be added to the reaction mixtures in which various amounts of inorganic phosphate were to be expected, without much chance of disturbance of the final colorimetric P-determinations by precipitated aneurinphosphomolybdate.

Of course other possibilities to avoid this difficulty were: 1st destroying aneurin before the addition of molybdic acid. We tried to do so by adding  $\text{SO}_2$ , but the reaction-products gave a similar precipitate with phosphomolybdic acid, 2nd employing another method of phosphate determination. However, all other methods are not only much more time-devouring but they are much less sensitive than FISKE and SUBBAROW's method. Hence we would have been compelled to use much higher amounts of aneurin, which would have been difficult to supply at the present time.

So we have persisted in employing the colorimetric method and have discarded all experiments in which precipitates had been formed.

The final experiments were carried out in the same way as in the example given above.

The reaction mixtures consisted of 30 mg of alkaline washed yeast in 2.5 cm<sup>3</sup> of citrate buffer; 0.5 cm<sup>3</sup> of citrate buffer or 0.5 cm<sup>3</sup> of citrate buffer containing 1.68 mg = 0.0050 mmol of aneurin; 2 cm<sup>3</sup> citrate buffer, containing 4.0 mg = 0.0125 mmol, of  $\alpha$ -glycerophosphate 6 aq., or 2.7 mg = 0.0125 mmol of  $\beta$ -glycerophosphate. Temp.: 27.5° C; reaction time: 30 minutes; pH 3.7.

2 mg of ascorbic acid were added as a reducing agent for the phosphomolybdic acid.

The results are given in table I.

TABLE I.

Substrate	$\gamma$ of P set free		% inhibition
	non-inhibited	inhibited	
$\alpha$ -glycerophosphate .....	46	26	48
$\beta$ -glycerophosphate .....	54	26	52

They show that with a molecular ratio  $\frac{\text{aneurin}}{\text{substrate}} = 0.4$  the inhibition amounts to 40–50%.

Thereupon we have determined at which molecular ratio's  $\frac{\text{aneurin}}{\text{substrate}}$  and  $\frac{\text{"pyrimidyl"}}{\text{substrate}}$  an inhibition of about 50% is found in the case of the decomposition of APP by our „top-yeast phosphatase”.

The reaction mixtures consisted of 5 mg of alkaline washed yeast, suspended in 6 cm<sup>3</sup> of phosphate solution, pH 3.7; 2 cm<sup>3</sup> of phosphate solution, pH 3.7, in which 0  $\gamma$ , 50  $\gamma$  and 250  $\gamma$  of aneurin or 500 and 2500  $\gamma$  of “pyrimidyl” were dissolved respectively; 2 cm<sup>3</sup> of phosphate solution, pH 3.7, containing 50  $\gamma$  of APP. Temp. 27.5° C. Immediately after mixing and after 30 minutes 2 cm<sup>3</sup> samples of the reaction-mixtures were pipetted into 2 cm<sup>3</sup> of 1½ % trichloroacetic acid. The precipitate was removed by centrifuging and 2 cm<sup>3</sup> of the clear centrifugate brought to pH 6.2 and diluted to 10 cm<sup>3</sup> by adding m/10 phosphate buffer, pH 6.2. 1 cm<sup>3</sup> samples of these solutions were used for APP determination with the manometric method (WARBURG technique) 1).

The results of these experiments are given in table II. 40–50% inhibition is now found with

TABLE II.

Inhibitor	Ratio $\frac{\text{mmol inhibitor}}{\text{mmol APP}}$	APP decomposed	% inhibition
—	0	47.5	—
50 $\gamma$ aneurin = 0.00015 mmol	1.5	40.0	15
250 $\gamma$ = 0.00075 ”	7.5	22.5	50
500 $\gamma$ “pyrimidyl” = 0.0024 ”	24	42.5	10
2500 $\gamma$ „ ” = 0.0120 ”	120	27.5	40

molecular ratio's  $\frac{\text{aneurin}}{\text{APP}} = 7.5$  and  $\frac{\text{"pyrimidyl"}}{\text{APP}} = 120$ . So we see, that the inhibition of the

decomposition of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glycerophosphate is even stronger than that of the APP decomposition, the reaction with which we discovered the inhibitory action of aneurin and related compounds on phosphatase action. These determinations show that the affinity of APP to “top-yeast phosphatase” is higher than that of the glycerophosphates to this enzyme. And without having carried out exact affinity determinations we may conclude that also aneurin has a rather high affinity to the phosphatase. In connection with these statements the above-mentioned observation that animal phosphatases, while readily attacking APP, do not seem to have any affinity to aneurin, is still more interesting. Perhaps this is an indication that both phosphatases act with different mechanisms.

The fact that aneurin inhibits much more effectively than “pyrimidyl” is in agreement with OCHOA and PETERS' statement that the stimulating effect of aneurin on carboxylase action is about 10 times stronger than the same effect by “pyrimidyl” 1), 4).

Our thanks are due to Prof. P. E. VERKADE, Delft, for samples of pure  $\alpha$ - and  $\beta$ -glycerophosphate.

### Summary.

Aneurin and related substances seem to be general inhibitors of "top-yeast phosphatase", but not of animal phosphatases. Not only the decomposition of aneurinpyrophosphate, where the phenomenon was discovered, but also that of  $\alpha$ - and  $\beta$ -glycerophosphate by the "top-yeast phosphatase" is strongly inhibited by aneurin. The molecular ratio's, at which 40 to 50 per cent inhibition was found, are the following:

$$\frac{\text{aneurin}}{\alpha\text{- or } \beta\text{-glycerophosphate}} = 0.4;$$

$$\frac{\text{aneurin}}{\text{aneurinpyrophosphate}} = 7.5;$$

$$\frac{2\text{-methyl-4-aminopyrimidyl-5-methylaminodihydrochloride}}{\text{aneurinpyrophosphate}} = 120.$$

### Zusammenfassung.

Aneurin scheint im allgemeinen ein Hemmungskörper der Wirkung der „Oberhefenphosphatase“, aber nicht der tierischen Phosphatasen zu sein. Nicht nur die Zersetzung des Aneurinpyrophosphats, bei deren Untersuchung das Phänomen entdeckt wurde, sondern auch die Zersetzung des  $\alpha$ -Glycerophosphats und des  $\beta$ -Glycerophosphats durch die erstgenannte Phosphatase werden durch Aneurin stark gehemmt. Die molekularen Verhältnisse, bei denen 40 bis 50 pct Hemmung auftritt, haben die folgenden Werte:

$$\frac{\text{Aneurin}}{\alpha\text{- oder } \beta\text{-Glycerophosphat}} = 0,4;$$

$$\frac{\text{Aneurin}}{\text{Aneurinpyrophosphat}} = 7,5;$$

$$\frac{2\text{-Methyl-4-aminopyrimidyl-5-methylaminodihydrochloride}}{\text{Aneurinpyrophosphat}} = 120.$$

- 1) H. G. K. Westenbrink, D. A. van Dorp, M. Gruber, H. Veldman, *Enzymol.* **9**, 73 (1940); see also H. G. K. Westenbrink, D. A. van Dorp, *Nature* **145**, 465 (1940). — 2) C. Oppenheimer, *Die Fermente und ihre Wirkungen*, Supplement I (1936), p. 144. — 3) R. Cloetens, *Enzymol.* **6**, 46 (1939). — 4) S. Ochoa, R. A. Peters, *Biochem. J.* **32**, 1501 (1938).

# Über den Einfluss von Phenylalkylaminen auf die Sauerstoffaufnahme von Hirngewebe

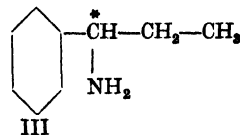
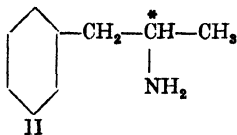
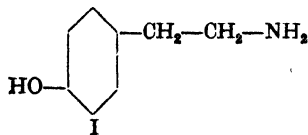
VON

W. FROENTJES

(Anorg. chem. Lab., Univ., Groningen (Holland))

(28.VI.41.)

§ 1.  $\beta$ -Phenylisopropylamin oder Benzedrin (II) ist in den letzten Jahren wegen seiner pharmakologischen Eigenschaften eingehend untersucht worden. Wegen seiner allgemein bekannten blutdruckerhöhenden und zentralerregenden Wirkung findet es u.a. bei der Behandlung von Narkolepsie bei Kindern Anwendung.



Daneben entdeckten QUASTEL und MANN<sup>1)</sup> neuerdings, dass die vergiftende Wirkung, die Tyramin (I) auf die  $O_2$ -Atmung von Hirngewebe *in vitro* ausübt, durch Benzedrin weitgehend gehemmt wird.

Tyramin und viele andere Amine, die im allgemeinen Zersetzungsprodukte von natürlichen Eiweisskörpern und Aminosäuren sind, wirken, wie QUASTEL<sup>2)</sup> u.a. bereits gezeigt haben, stark vergiftend auf die  $O_2$ -Aufnahme oder Oxydation der Glucose und anderer Metabolite im Hirngewebe. Diese Amine werden dabei oxydiert oder desaminiert; in den meisten Fällen konnte neben  $NH_3$  ein Aldehyd oder Keton als Zersetzungsprodukt nachgewiesen werden<sup>(3)</sup>.

Die Oxydation dieser Amine wird, der heutigen Auffassung nach, durch ein Enzym, die Monoaminooxyhydrase nach der Nomenklatur von OPPENHEIMER<sup>3a)</sup> (früher Tyraminoxidase), katalysiert. Die entstehenden Aldehyde oder Ketone wirken auf die weitere Oxydation anwesender Metabolite stark vergiftend.

Auch Benzedrin besitzt, wenigstens in Konzentrationen von mehr als 0,1 % einen ähnlichen vergiftenden Einfluss. Während aber Tyramin z.B. dabei erst desaminiert wird, konnte QUASTEL beim Benzedrin keine Desaminierung feststellen.

Ebensowenig konnte BLASCHKO<sup>4)</sup> bei der Einwirkung von Aminooxyhydrasepräparaten auf Benzedrin und andere Isopropylaminderivate eine Oxydation feststellen. Die vergiftende Wirkung, die das Benzedrin ausübt, muss also auf andere Ursachen zurückgehen als beim Tyramin.

Überdies wirkt Tyramin im Gegensatz zum Benzedrin, das unterhalb 0,1 % beinahe wirkungslos ist, noch bei einer Konzentration von 0,08 % stark vergiftend.

Diese Isopropylamine werden aber nicht nur an sich nicht oxydiert, sondern verhindern überdies, wie BLASCHKO bereits bemerkte, auch die Oxydation anderer Amine wie Tyramin.

Nach QUASTEL sollen diese Isopropylamine instande sein, die Aminooxyhydrase in irgendeiner Weise zu binden und so die Oxydation anderer Amine zu verhindern, Womit sich auch erklärt, dass Benzedrin die vergiftende Wirkung von Tyramin auf die Metabolitoxydation im Hirngewebe zu hemmen vermag.

§ 2. Die Antipoden optisch aktiver, pharmakologisch wirksamer Stoffe zeigen in vielen Fällen verschiedene physiologische Wirkung. Die Grösse und Art dieser Verschiedenheit sind jedoch meist weitgehend abhängig von dem physiologischen Vorgang, den man untersucht. In der Reihe der Phenylalkylamine mit asymmetrischem C-Atom ist von einer verschiedenen physiologischen Wirkung der optischen Antipoden noch wenig bekannt.

Am besten untersucht ist das Ephedrin, doch laufen hier die Angaben einzelner Autoren über die Wirkungsunterschiede sehr auseinander und sind zum Teil einander widersprechend <sup>(5)</sup>.

Beim Benzedrin fand ALLES <sup>(6)</sup> in der Weckwirkung bei Kaninchen einen ziemlich grossen Unterschied zwischen den Antipoden. Dagegen gelang es HAUSCHILD <sup>(5)</sup> nicht, einen Unterschied in der blutdruckerhöhenden und toxischen Wirkung von *d,l*- und *d*-Benzedrin bei Mäusen zu finden.

Es schien daher erwünscht, zu untersuchen ob, erstens *d*- und *l*-Benzedrin Unterschiede in ihrer vergiftenden Wirkung auf die O<sub>2</sub>-Atmung von Hirngewebe zeigen und zweitens, inwiefern die hemmenden Einflüsse der beiden optisch isomeren Benzedrine auf die vergiftende Wirkung des Tyramins auf diese O<sub>2</sub>-Aufnahme auseinandergehen.

Auch das mit Benzedrin struktur-isomere  $\alpha$ -Phenylpropylamin (III) ist unseres Wissens bis jetzt noch nicht bezüglich seines physiologischen Verhaltens geprüft worden. Dieses Amin wurde darum in derselben Richtung wie das Benzedrin untersucht.

§ 3. Die Darstellung und Spaltung des  $\beta$ -Phenylisopropylamins und  $\alpha$ -Phenylpropylamins wurden früher <sup>(7)</sup> beschrieben.

Die Bestimmung des O<sub>2</sub>-Verbrauchs von Hirngewebe wurde in WARBURGMANOMETERN nach DIXON—BARCROFT mit Luft ausgeführt.

Das Hirngewebe ( $\pm 3$  g), einer *Cavia* wurde unmittelbar in einem Mörser zerrieben und mit soviel einer 1/45 mol., 0,9 % NaCl. enthaltenden, Phosphatpufferlösung geschüttelt, dass das Volum der Suspension 6 cc betrug (ph = 7,4). Für jede Bestimmung wurde von dieser Suspension 1 cc (=  $\frac{1}{2}$  g) in das Reaktionsgefäss des Manometers pipettiert, mit dem zu untersuchenden Amin (Endkonzentration 0,08 %) und eventuell mit Tyramin (Endkonz. 0,07 %) versetzt.

Die Amine wurden als Sulfate, das Tyramin als Chlorhydrat angewendet. In dem Vergleichsmanometergefäss wurde 1 cc der Gehirnsuspension bis auf ein gleiches Volum mit NaCl-Pufferlösung verdünnt. Das entstandene Kohlendioxyd wurde in üblicher Weise mittels starker Kalilauge absorbiert. Die Gehirn-Aminmischung wurde dann während ungefähr  $2\frac{1}{2}$  Stunden im Thermostaten bei 37° C mit konstanter Geschwindigkeit geschüttelt, bis die O<sub>2</sub>-Aufnahme auf ungefähr 50 % des Anfangswertes zurückgegangen war. Nachdem in dieser Weise die anwesenden Metabolite zum grössten Teil oxydiert, und die Suspension während  $2\frac{1}{2}$  Stunden der Einwirkung der Amine ausgesetzt worden war, wurde Glucose zugesetzt (Endkonz. 0,05 %) und die O<sub>2</sub>-Aufnahme gemessen, wobei während 2 Stunden alle 10 bzw. 20 Minuten die Manometer abgelesen wurden.

§ 4. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt. Diese Tabelle enthält die Werte für die Abnahme des O<sub>2</sub>-Verbrauchs in Prozenten des Anfangswertes, d.h. unmittelbar nach dem Glucosezusatz \*). Die Tabelle gibt die Mittelwerte von 2 oder 3 Versuchen.

Man erkennt aus den in ihr mitgeteilten Daten, dass Benzedrin in einer Konzentration von 0,08 % nur noch einen geringen vergiftenden Einfluss auf die O<sub>2</sub>-Aufnahme, bzw. Oxydation von Glucose ausübt, während dieses Amin nach QUASTEL in einer Konzentration von 0,1 % bereits sehr stark vergiftet. Ein Unterschied zwischen den optischen Isomeren konnte nicht festgestellt werden. Die gefundenen Unterschiede liegen jedenfalls innerhalb der Versuchsfehler \*\*).

Die Wirkung des  $\alpha$ -Phenylpropylamins ist, wenigstens bei vergleichbarer Konzentration, der des Benzedrins sehr ähnlich. Sein vergiftender Einfluss auf die O<sub>2</sub>-Aufnahme ist aber offenbar noch geringer \*\*\*). Dagegen hat man den Eindruck, dass die *d*-Form etwa 20 % stärker wirksam ist als die *l*-Form.

§ 5. Aus der Tabelle erkennt man weiterhin die stark vergiftende Wirkung des Tyramins †).

\*) Da es sich hier nur um eine Vergleichung der Amine und ihrer Antipoden handelt, dürften diese Angaben genügen.

\*\*) Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen HAUSCHILDS. In wiefern bei diesen Isomeren ein Unterschied zu erwarten ist, ist schwierig voraus zu sagen; die Bindungsweise des Benzedrins an die Aminoxyhydrase ist ja unbekannt.

\*\*\*) Die geringere Wirksamkeit des  $\alpha$ -Phenylpropylamins gegenüber Benzedrin ist in Übereinstimmung mit der bekannten Tatsache, dass eine Verschiebung der NH<sub>2</sub>-Gruppe vom  $\beta$ - nach dem  $\alpha$ -C-Atom eine geringere physiologische Wirkung zur Folge hat.

†) Die hier gefundene Abnahme des O<sub>2</sub>-Verbrauchs bis auf 32 % des Anfangswertes innerhalb zweier Stunden ist in guter Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen von QUASTEL.



Die gefundenen Werte für die Abnahme des  $O_2$ -Verbrauchs nach einer Stunde zeigten ziemlich starke Schwankungen, die man vielleicht auf die Anwesenheit von zuvor schon in wechselnder Menge anwesenden Metaboliten zurückführen muss. Wenn man nämlich von vornherein den Präparaten Glucose, also viel Metabolit, zufügt, so wirkt das Tyramin nur wenig vergiftend auf die  $O_2$ -Aufnahme. Man findet sogar, nach Zufügen des Tyramins, einen erhöhten  $O_2$ -Verbrauch,

TABELLE I

Amine	Abnahme des $O_2$ -Verbrauchs von $\frac{1}{2}$ g Hirngewebe in Prozenten des Anfangswertes, nach Zusatz von Glucose (0,05 %), nachdem es vorher während $2\frac{1}{2}$ Stunden der Einwirkung der in dieser Tabelle erwähnten Amine (0,07 %) ausgesetzt worden ist.	
	nach 1 Stunde	nach 2 Stunden
—	97	95
Tyramin .....	60	32
<i>d</i> -Benzedrin .....	90	60
<i>l</i> -Benzedrin .....	80	65
<i>d</i> -Phenylpropylamin ...	80	70
<i>l</i> -Phenylpropylamin ....	95	85
<i>d,l</i> -Benzedrin + Tyramin	80	67
<i>d</i> -Benzedrin + Tyramin	77	65
<i>l</i> -Benzedrin + Tyramin	82	70
<i>d</i> -Phenylpropylamin + Tyramin	75	50
<i>l</i> -Phenylpropylamin + Tyramin	80	60
Tyramin (+ <i>l</i> -Benzedrin*)	60	33
<i>l</i> -Benzedrin (+ Tyramin **)	90	70

\*) Das Benzedrin ist erst nach  $2\frac{1}{2}$  Stunden gleichzeitig mit der Glucose hinzugefügt.

\*\*) Das Tyramin ist nach  $2\frac{1}{2}$  Stunden gleichzeitig mit der Glucose hinzugefügt.

der vermutlich auf die Zersetzung des Tyramins selbst zurückgeht. Die unter diesen Umständen entstandenen Zersetzungsprodukte des Tyramins sind jedoch vielleicht anderer Natur als sonst, sie wirken wenigstens nur schwach vergiftend. Versuche bei denen der  $O_2$ -Verbrauch einmal bei Anwesenheit von Tyramin allein und andererseits mit Tyramin + *d,l*-Benzedrin gemessen wurde, ergaben im ersten Falle eine zweimal schnellere Abnahme des  $O_2$ -Verbrauchs als im zweiten, also einen stark hemmenden Einfluss von *d,l*-Benzedrin auf die vergiftende Wirkung des Tyramins.

Es stellte sich weiter heraus, dass die beiden optisch isomeren Benzidine einen ungefähr gleich starken derartig hemmenden Einfluss besitzen. Dass hier das Tyramin in seiner Wirkung praktisch vollkommen ausgeschaltet wird, beweist wohl die Tatsache, dass der  $O_2$ -Verbrauch bei Anwesenheit von Benzedrin mit oder ohne Tyramin derselbe ist.

Auch  $\alpha$ -Phenylpropylamin wirkt hemmend auf die vergiftende Wirkung des Tyramins, aber weniger stark als Benzedrin. Es ergibt sich nämlich, dass hier die Abnahme des  $O_2$ -Verbrauchs bei Anwesenheit von Tyramin ungefähr 40% grösser ist, während beim Benzedrin das Tyramin keinerlei Einfluss ausübt (s.O.).

Ebenso wie in der vergiftenden Wirkung wurde auch in dem hemmenden Einfluss der beiden isomeren  $\alpha$ -Phenylpropylamine ein kleiner Unterschied gefunden und zwar hemmt das *d*-Isomere ungefähr 20% stärker als das *l*-Isomere.

Unterwirft man das Gehirnpräparat erst während 1 bis 2 Stunden der Einwirkung von Tyramin und fügt dann erst, gleichzeitig mit der Glucose, das Benzedrin hinzu, so wirkt das Tyramin ebenso stark vergiftend als ohne Benzedrin. Hat man dagegen zuerst Benzedrin zugefügt und später Tyramin, dann übt das Tyramin keinen vergiftenden Einfluss mehr auf die  $O_2$ -Aufnahme aus. Diese Versuche bestätigen die Hypothese QUASTELS, dass Benzedrin die Aminoxhydrase und nicht etwa die

Zersetzungsprodukte des Tyramins zu binden vermag. (Siehe Tabelle I, die letzten zwei Versuche).

Auch die Farbänderungen des Präparates kann man in dieser Weise deuten. Setzt man nämlich dem Präparat erst Tyramin zu, so färbt sich dieses ziemlich schnell bräunlich, während im anderen Falle, wenn man gleichzeitig Benzedrin (oder  $\alpha$ -Phenylpropylamin) und Tyramin hinzufügt, das Präparat seine ursprüngliche rosa-graue Farbe behält.

QUASTEL<sup>8)</sup> führte diese Farbänderung oder Pigmentbildung auf Verunreinigungen des Tyramins zurück, da er nachweisen konnte, dass die Entstehung von Methämoglobin nicht die Ursache der Farbänderung war.

Diese Auffassung QUASTELS ist u.E., nach dem Dargelegten, nicht sehr wahrscheinlich. Man müsste annehmen, dass diese Dunkelfärbung durch irgendwelche Verunreinigungen, auch durch die Aminoxhydrase katalysiert wird, weil Benzedrin sie ja verhindert. Überdies stellte sich heraus, dass sowohl das Handelsprodukt als auch das von uns selbst aus Tyrosin dargestellte und sorgfältigst umkrystallisierte Tyramin die Gehirnpräparate gleich stark färbten. Man wird die Farbänderung den Oxydationsprodukten des Tyramins selbst zuschreiben müssen, was bei dem phenolartigen Charakter des Tyramins auch verständlich wäre.

§ 6. Die Einwirkung von *l*- und *d*-Benzedrin auf Darmpräparate wurde von R. BRINKMAN untersucht. Ein Suspensionspräparat von frischem *Caviadarm* in TYRODELOSUNG und O<sub>2</sub>-Atmosphäre wurde bei 37° C der Einwirkung der Amine ausgesetzt.

In einer Konzentration von 1:500.000 hatte Benzedrin keine Wirkung, bei 1:100.000 entstand erst nach ungefähr 20 Sekunden eine geringe Tonuserhöhung, die nach einigen Minuten plötzlich verschwand und von einer starken Kontraktion gefolgt wurde. *l*- und *d*-Benzedrin zeigten aber auch in dieser Hinsicht wenig Unterschied \*).

Dagegen fand J. JONXIS \*\*), dass bei der Narkolepsiebehandlung von Kindern *d,l*- und *d*-Benzedrin nahezu gleiche, aber dreimal so starke Wirkung als *l*-Benzedrin zeigten. Dieses Ergebnis ist in bester Übereinstimmung mit den kurzen Bemerkungen von ALLES<sup>6)</sup>.

### Zusammenfassung.

1. *d,l*-, *d*- und *l*- $\beta$ -Phenylisopropylamin (Benzedrin) zeigen weder hinsichtlich der Vergiftung der Glucoseoxydation in Hirngewebe, noch bezüglich der Hemmung der vergiftenden Wirkung von Tyramin bei dieser Oxydation, merkliche Unterschiede.

2.  $\alpha$ -Phenylpropylamin wirkt bei den genannten Reaktionen deutlich, aber weniger stark, im gleichen Sinne wie das Benzedrin. Doch erweist sich die *d*-Form diesesamins als ungefähr 20% stärker wirksam als die *l*-Form.

3. Darmpräparate werden durch *d*- und *l*-Benzedrin gleich stark beeinflusst, dagegen erweisen sich bei der Behandlung von Narkolepsie bei Kindern *d*- und *d,l*-Benzedrin als ungefähr dreimal so wirksam wie das *l*-Isomere.

Herrn Prof. Dr. R. BRINKMAN, in dessen Laboratorium die obigen Versuche ausgeführt wurden, möchte ich für sein freundliches Entgegenkommen und die Förderung meiner Arbeit auch an dieser Stelle bestens danken. Auch Frl. Dr. J. VEGTER bin ich für ihre Unterstützung zu bestem Dank verpflichtet.

1) J. H. Quastel, P. J. Mann, *Nature* **144**, 943 (1939). — 2) J. H. Quastel, A. H. Wheatley, *Biochem. J.* **27**, 1609 (1933). — 3) C. E. Pugh, J. H. Quastel, *Biochem. J.* **31**, 286, 2306 (1937); F. J. Philpot, *Biochem. J.* **31**, 856 (1937). — 3a) C. Oppenheimer, *Die Fermente und ihre Wirkungen*, V. Aufl., Suppl., Den Haag, 1939. — 4) H. Bläschko, D. Richter, H. Schlossmann, *Biochem. J.* **31**, 2187 (1937). — 5) Siehe u.a. F. Hauschild, *Arch. für exp. Path.* **195**, 647 (1940). — 6) G. A. Alles, *Amer. J. Phys.* **126**, 420 (1939). — 7) F. M. Jaeger, J. A. van Dyk, *Proc. Ned. Akad. v. Wetensch. Amsterdam* **44**, 26 (1941); F. M. Jaeger, W. Froentjes, *ibid.* **44**, 21 (1941). — 8) C. E. Pugh, J. H. Quastel, *Biochem. J.* **31**, 2309 (1937). — 9) H. Reiser, *Arch. für exp. Path.* **195**, 605 (1940).

\*) H. REISER<sup>9)</sup> hat ähnliche Beobachtungen an einem anderen Darmpräparat mit *d,l*-Benzedrin mitgeteilt.

\*\*) Privatmitteilung.

# Sur les $\beta$ -glucuronides et la $\beta$ -glucuronidase

PAR

M. FLORKIN, R. CRISMER, G. DUCHATEAU ET R. HOUET

*(Labor. de Chimie physiol. de l'Univ. de Liège)*

Avec 4 figures.

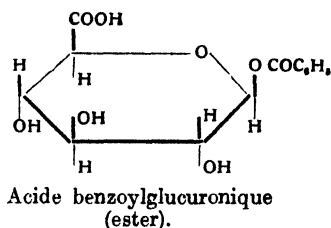
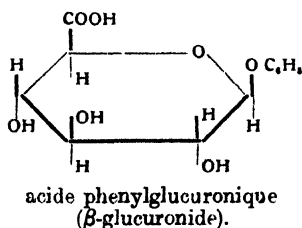
(10.VI.41.)

## Introduction.

Les organismes ont acquis au cours de l'évolution certaines capacités de synthèse qu'on peut désigner par la dénomination générale de synthèses d'excrétion. Telle est la transformation en urée, dans le foie des Mammifères, de l'ammoniaque résultant de la désamination des acides aminés, ou encore la transformation de cette ammoniaque en acide urique dans le foie des Oiseaux. Ces synthèses représentent souvent des actions antitoxiques au cours desquelles des corps toxiques introduits dans l'organisme ou résultant de son fonctionnement sont, par combinaison avec d'autres substances, incorporés à des complexes non toxiques et conduits sous cette forme aux organes excréteurs. C'est ce qui se produit notamment dans la conjugaison de diverses substances avec l'acide glucuronique, ou glucuronoconjugaison, l'une des formes de détoxication (ou introduction dans un complexe voué à l'excrétion) dont sont doués les organismes des Mammifères. L'acide glucuronique se combine avec de nombreux alcools, phénols et acides aromatiques.

La conjugaison se fait selon deux modes bien distincts. Dans les glucuronoconjugués du type éther-oxyde, le groupement oxhydryle d'un alcool ou d'un phénol est conjugué avec l'oxhydryle pseudoaldéhydique du groupement réducteur de l'acide glucuronique. Les corps ainsi formés à partir de l'acide  $\beta$ -glucuronique ont beaucoup d'analogies avec les  $\beta$ -glucosides; aussi les appelle-t-on souvent  $\beta$ -glucuronides.

Quant aux glucuronoconjugués du type ester, ils résultent de l'estérification par le groupement carboxyle d'un acide aromatique, de l'oxhydryle pseudoaldéhydique du groupement réducteur de l'acide glucuronique. Voici, pour fixer les idées, la formule de structure d'un représentant de chacun des deux types de glucuronoconjugués:



L'étude de la glucuronoconjugaison et du métabolisme de l'acide glucuronique, question si importante pour la physiologie comme pour la pathologie, est encore peu avancée, surtout par suite de l'existence de difficultés techniques. Nous apportons dans la deuxième partie du présent mémoire une contribution à la solution de ces difficultés en décrivant un procédé photométrique pour le dosage des glucuronoconjugués du type éther-oxyde (ensemble des glucuronides) applicable à l'urine. Dans les essais qui ont abouti à l'établissement de cette méthode, nous avons utilisé comme glucuronide typique l'acide bornéolglucuronique. Nous décrivons dans la première partie de ce travail une méthode de préparation de ce glucuronide, que nous

utilisons aussi comme point de départ pour la préparation de l'acide glucuronique libre selon la méthode de A. J. QUICK<sup>29</sup>). Nous avons appliqué la méthode photométrique décrite dans la deuxième partie au dosage des glucuronides sanguins et à celui de l'acide pregnandiolglucuronique urinaire: les procédés proposés pour ces dosages sont décrits dans la troisième et dans la quatrième partie. La cinquième partie a trait à la mesure de l'activité des préparations de  $\beta$ -glucuronidase, enzyme présent dans les différents tissus animaux et qui réalise l'hydrolyse des  $\beta$ -glucuronides. A l'aide de cet enzyme, nous avons accompli la synthèse enzymatique de l'acide bornéolglucuronique, dans des expériences décrites dans la cinquième partie du présent mémoire.

### I. Préparation de l'acide bornéolglucuronique.

Ce glucuronide se prépare à partir de son sel de zinc, isolé des urines de chiens recevant du bornéol avec leurs aliments. Cette méthode, utilisée d'abord par E. FROMM et P. CLEMENS<sup>9</sup>) a été perfectionnée par différents auteurs: A. J. QUICK<sup>29</sup>), J. PRYDE et R. T. WILLIAMS<sup>26</sup>), W. F. GOEBEL et F. T. BABERS<sup>11</sup>) et M. CHAMBON<sup>4</sup>). La méthode que nous proposons diffère de ces procédés par divers perfectionnements et simplifications. Son principe est le suivant:

1. Récolte des urines de chiens recevant quotidiennement 5 gr. de bornéol.
2. Défécation de ces urines par l'acétate de plomb neutre.
3. Précipitation du bornéolglucuronate de zinc par addition à chaud d'acétate de zinc.
4. Transformation par acidification en acide bornéolglucuronique.
5. Purification de l'acide bornéolglucuronique par dissolution dans l'éther, filtration et recristallisation.

**Réactifs.** 1. Solution d'acide acétique à 35 p. 100. 2. Solution d'acétate de plomb neutre à 5 p. 100. 3. Solution saturée d'acétate de zinc. 4. Solution d'acide sulfurique 3,5 N. 5. Solution de diphenylamine à 1 p. 100 dans l'acide acétique glacial. 6. Solution de ferricyanure de potassium à 0,5 p. 100. 7. Éther sulfurique.

**Récolte des urines contenant le bornéolglucuronate.** On utilise des chiens de petite taille, pesant de 7 à 12 kilos, placés dans des cages à métabolisme. On recueille quotidiennement leurs urines. Les chiens reçoivent une alimentation mixte, inspirée du régime de QUICK<sup>30</sup>) et constituée par un mélange de 20 gr. de saindoux, de 30 gr. de caséine, de 25 gr. de saccharose, de 5 gr. de levure de bière et de 1 gr. de poudre d'os. On mélange intimement à cette ration 5 gr. de bornéol finement pulvérisé. Le goût de la substance glucuronogénique est fortement atténué par le mélange avec les aliments et les animaux ne refusent jamais leur nourriture. De plus, on ne note aucun signe d'intoxication, même après administration prolongée du bornéol.

**Séparation du glucuronide à l'état de sel de zinc impur.** Les urines, acidifiées par l'acide acétique (papier de tournesol), subissent une défécation à l'acétate de plomb neutre, qui élimine l'acide urique, les pigments et une série d'autres substances. Pour déterminer la quantité d'acétate de plomb à ajouter pour réaliser une défécation complète sans ajouter un trop grand excès d'acétate, on procède comme suit. Dans quatre tubes de centrifugeur, on pipette 2 cm<sup>3</sup> d'urine. Dans ces quatre tubes on introduit respectivement 0,1, 0,2, 0,3 et 0,4 cm<sup>3</sup> d'acétate de plomb. Après centrifugation, on ajoute dans chaque tube une goutte d'acétate de plomb pour repérer le tube correspondant à la défécation totale. S'il se produit encore un trouble dans tous les tubes, on ajoute à chacun d'eux 0,4 cm<sup>3</sup> de solution d'acétate de plomb et on centrifuge de nouveau, puis on refait l'épreuve de l'addition d'une goutte de réactif dans chacun des tubes. On détermine ainsi la quantité d'acétate de plomb qui doit être ajoutée à l'urine pour produire une défécation complète sans addition d'un excès de réactif. Le filtrat de cette défécation, recueilli dans un grand vase de Berlin, est porté à l'ébullition. On ajoute alors petit à petit la solution saturée d'acétate de zinc. Il se produit aussitôt un abondant précipité cristallin de bornéolglucuronate de zinc. On ajoute de l'acétate de zinc jusqu'à ce que la précipitation soit totale. A ce moment, on verse le contenu du vase de Berlin sur un filtre plat en papier porté par un entonnoir de BÜCHNER. Le précipité est lavé à l'eau chaude jusqu'à élimination complète de toute substance colorée. Le précipité blanc recueilli sur le filtre est séché et pulvérisé: c'est une préparation impure de bornéolglucuronate de zinc, qui peut être conservée pour servir ultérieurement de matériel pour la préparation d'acide bornéolglucuronique pur.

**Purification du glucuronide.** Le premier temps de cette opération consiste à transformer le bornéolglucuronate de zinc en acide bornéolglucuronique. Pour cela, on dissout 100 gr. de bornéolglucuronate de zinc dans 150 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique 3,5 N chaud. On refroidit rapidement la solution en la plaçant à la glacière. Après quelques heures, il se forme au fond du récipient un abondant précipité d'acide bornéolglucuronique. On recueille le précipité sur un filtre plat et on le lave avec de l'eau distillée à 0°, dans laquelle le bornéolglucuronide est peu soluble. Pour obtenir un bon rendement, il faut continuer le lavage du précipité jusqu'à enlèvement complet de toute trace d'ion zinc, mais non

point au delà. Pour déceler le zinc dans l'eau de lavage ayant traversé le filtre, on procède comme suit: dans un tube à réaction, on verse 5 gouttes d'une solution de diphénylamine à 1 p: 100 dans de l'acide acétique glacial. On ajoute 5 cm<sup>3</sup> d'une solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 0,5 p. 100. On additionne le mélange des deux réactifs, de 2 à 5 cm<sup>3</sup> de filtrat. La réaction de détection du zinc est positive quand il se produit un précipité vert.

Le précipité blanc recueilli sur le filtre est séché à l'air. Il est finalement dissous dans l'éther. La solution étherée est filtrée et évaporée. On élimine ainsi les traces de substances étrangères non éthersolubles et notamment le bornéol qui aurait pu prendre naissance au cours des opérations, à la suite de l'hydrolyse d'une fraction du glucuronide.

**Rendement de la méthode.** Le rendement est excellent. On obtient, par gramme de bornéol, administré aux chiens, 0,85 gr. d'acide bornéolglucuronique pur. La préparation est par ailleurs très pure. Elle se présente sous l'aspect de fines aiguilles prismatiques semblables à celles décrites par E. FROMM et P. CLEMENS<sup>9)</sup> qui isolèrent les premiers la substance. Ces cristaux n'ont aucune odeur urinaire. Ils sont solubles dans l'eau distillée jusqu'à une concentration d'environ 2 p. 100.

Contrairement aux solutions de préparations impures, qui sont troubles, les solutions du glucuronide préparé selon la méthode décrite sont parfaitement limpides. Le point de fusion est de 175°, correspondant à celui trouvé par H. HILDEBRANDT<sup>13)</sup> d'abord, et par J. PRYDE et R. T. WILLIAMS<sup>26)</sup> ensuite.

## II. Dosage des glucuronides urinaires.

Une série de méthodes ont été proposées pour le dosage des glucuronoconjugués urinaires. Les glucuronoconjugués, dérivés du  $\beta$ -pyranose, sont comme leurs proches parents, les  $\beta$ -glucosides, lévogyres. Aussi a-t-on proposé de mesurer leur concentration dans l'urine par des procédés polarimétriques, que rendent d'ailleurs peu applicables la forte teneur en sels de l'urine et le fait qu'elle contient d'autres substances optiquement actives.

Chauffé en présence d'acide chlorhydrique à la concentration de 12 p. 100, l'acide glucuronique donne naissance à du furfural, qui peut être distillé. C. TOLLENS<sup>35)</sup> avait déjà, au cours des premiers travaux sur l'acide glucuronique, tenté d'appliquer ce procédé à son dosage. Malheureusement, les différents glucuronoconjugués fournissent des quantités différentes de furfural et ce dernier se détruit au contact des acides forts. La méthode reste imprécise et inutilisable, malgré les perfectionnements qui lui ont été apportés par N. C. PERVIER et E. A. GORTNER<sup>25)</sup> qui ont tenté de réduire au minimum le contact du furfural avec l'acide chlorhydrique, et par O. FURTH et K. PESCHECK<sup>10)</sup> qui ont appliqué au dosage du furfural formé la méthode de YOUNBURG. Nous n'avons pas nous-mêmes eu plus de succès dans une tentative d'application, au dosage du furfural formé, de la méthode de G. E. ROE<sup>31)</sup>.

Tout aussi imprécis sont les résultats de la méthode de C. NEUBERG et W. NEIMANN<sup>21)</sup> dans laquelle on dose à l'état de sel argentique l'acide saccharique résultant de l'oxydation de l'acide glucuronique par le brome, sous pression.

L'acide glucuronique libre étant réducteur, on a à plusieurs reprises utilisé cette propriété en vue du dosage. C'est le cas dans la méthode de A. J. QUICK<sup>27)</sup> pour le dosage de l'acide mentholglucuronique dans l'urine. L'extract étheré de l'urine y est hydrolysé à chaud et l'acide glucuronique dosé par réduction. Ce procédé, s'il élimine bien l'interférence de diverses substances réductrices insolubles dans l'éther, comme les oses, ne peut être tenu pour spécifique de l'acide mentholglucuronique puisque d'autres glucuronoconjugués dont aussi solubles dans l'éther, et par ailleurs il ne dose que les glucuronoconjugués éthersolubles.

On a aussi tenté d'adapter au dosage des glucuronoconjugués de l'urine l'important test qualitatif de l'acide glucuronique qu'est la réaction de TOLLENS. Chauffé à 100° en présence de HCl et de naphtorésorcine (1—3 dioxynaphtalène), l'acide glucuronique donne naissance à une substance bleue dont la solution étherée est bleu-violet. Appliquée à l'urine, cette réaction, du fait de colorations développées dans les mêmes conditions par d'autres constituants de l'urine, est inutilisable en vue du dosage. Différentes méthodes ont été proposées en vue de l'élimination préalable de ces substances gênantes. On trouvera une bibliographie de ces travaux, jusqu'à 1931, dans un mémoire de C. NEUBERG et M. KOBEL<sup>20)</sup>. Aucune de ces méthodes n'est applicable

aux urines contenant du glucose et des pentoses. Parmi les essais plus récents d'application de la réaction de TOLLENS à l'urine, citons la méthode de G. B. MAUGHAN, K. A. EVELYN et J. S. L. BROWNE<sup>18)</sup> sur laquelle nous reviendrons dans la suite.

Nous avons mis au point un procédé permettant le dosage suffisamment précis, dans l'urine, même en présence d'acide glucuronique libre, de glucose ou de pentoses, de l'ensemble des glucuronoconjugués du type éther-oxyde, c'est à dire de la grande majorité des glucuronoconjugués physiologiques. Ce procédé repose sur la purification de l'urine par une série d'étapes: déglucidation par la méthode de D. D. VAN SLYKE<sup>37)</sup>, au cours de laquelle l'alcalinisation amène une hydrolyse des glucuronoconjugués du type ester tandis que les glucuronides ne sont pas attaqués et qui enlève une série de substances dont le glucose, les pentoses, l'acide glucuronique libre, etc., défécation par l'acétate mercurique, qui enlève d'autres substances dont l'indirubine; traitement par l'acide sulfhydrique, qui élimine l'excès de cuivre et de mercure résultant des traitements précédents. A l'urine ainsi traitée, nous appliquons la modalité de la réaction de TOLLENS proposée par MAUGHAN, EVELYN et BROWNE et nous terminons par une mesure photométrique au moyen du photomètre de PULFRICH.

#### Réactifs.

1.  $\text{CuSO}_4$  à 20 p. 100.
2. Suspension de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  à 10 p. 100.
3. Solution d'acétate mercurique à 25 p. 100. On dissout l'acétate mercurique dans de l'eau glacée en écrasant les grumeaux avec une baguette de verre. La solution est filtrée et conservée à la glacière.

4.  $\text{HCl}$ , D: 1,19, dilué par addition d'un volume égal d'eau.

5. Solution de naphtorésorcine à 0,2 p. 100 (MAUGHAN, EVELYN et BROWNE<sup>18)</sup>). On fait une solution aqueuse de naphtorésorcine à 2 p. 100 (Nous utilisons le produit HOFFMANN—LA ROCHE). Le flacon contenant la solution est laissé pendant 24 heures à l'étuve à 38° et agité de temps à autre. On filtre et on conserve à l'obscurité dans la glacière à 3—5°. Le réactif se conserve, selon notre expérience, pendant trois semaines.

6. Alcool à 96°.

7. Ether préparé selon les indications de MAUGHAN, EVELYN et BROWNE<sup>18)</sup>. De l'éther (produit MERCK selon la pharmacopée) est, immédiatement avant son utilisation, lavé avec une solution à 1 p. 100 de sulfate ferreux puis avec de l'eau distillée et séché par addition de quelques cristaux de sulfate de sodium.

8. Hydroxyde sodique en solution concentrée.

9. Solution de glucurone. On fait une solution de glucurone HOFFMANN—LA ROCHE à 9,07 mg p. 100  $\text{cm}^3$ . 1  $\text{cm}^3$  de cette solution correspond à 100  $\gamma$  d'acide glucuronique. La solution se conserve en glacière pendant un mois.

**Préparation du filtrat de défécation.** Dans un ballon de 50  $\text{cm}^3$ , on met 20  $\text{cm}^3$  d'urine filtrée. On ajoute 10  $\text{cm}^3$  de la solution de sulfate cuivrique (Réactif 1) puis 10  $\text{cm}^3$  de la suspension d'hydroxyde calcique (Réactif 2). On amène au trait de jauge avec de l'eau distillée, on mélange et on abandonne pendant une demi-heure en homogénéisant fréquemment, puis on filtre. 20  $\text{cm}^3$  du filtrat sont mis dans un ballon jaugé de 25  $\text{cm}^3$ . On ajoute 4  $\text{cm}^3$  d'acétate mercurique (Réactif 3) et de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge, on mélange et on filtre. Dans le filtrat on fait passer un courant d'acide sulfhydrique et on filtre sur papier SCHLEICHER et SCHULL 602 e h, qui retient le précipité de sulfures. On chasse l'excès de  $\text{H}_2\text{S}$  par barbotage d'air.

**Réaction de coloration.** Dans un tube en verre Pyrex ou Duran de 20 cm de long et de 2 cm de large, qu'on peut fermer au moyen d'un bouchon de verre bien rodé, on met 2  $\text{cm}^3$  du filtrat, qui est parfaitement clair. On ajoute 2  $\text{cm}^3$  d'acide chlorhydrique (Réactif 4) et 2  $\text{cm}^3$  de la solution de naphtorésorcine (Réactif 5). Le tube est laissé au bain-marie bouillant pendant une demi-heure, puis dans la glace fondante pendant 10 minutes. On ajoute alors 2  $\text{cm}^3$  d'alcool (Réactif 6) et 15  $\text{cm}^3$  d'éther (Réactif 7). On bouche et on secoue vigoureusement le tube pendant une demi-minute pour extraire le colorant formé. Pour chaque échantillon d'urine on doit préparer aussi un extrait qui servira de solution de comparaison pour la mesure photométrique. Pour cela, on met dans un ballon jaugé de 50  $\text{cm}^3$ , 20  $\text{cm}^3$  d'urine: on ajoute 5  $\text{cm}^3$  d'acide chlorhydrique (Réactif 4) et on laisse pendant une demi-heure au bain-marie bouillant. Tous les glucuronoconjugués sont ainsi hydrolysés. Après refroidissement et neutralisation par une quantité de soude (Réactif 8) équivalente à la quantité d'acide chlorhydrique ajoutée, on applique à la solution le traitement décrit plus haut (défécation et réaction de coloration). Dans le cas présent, le traitement par le sulfate cuivrique en milieu alcalin enlèvera l'acide glucuronique résultant de l'hydrolyse des glucuronoconjugués. Dans chaque série de déterminations il faut encore établir la position de la droite d'étalonnage pour la mesure photométrique. Pour fixer sa position, on traite de la même façon que le filtrat de défécation de l'urine, des quantités de la solution de glucurone (Réactif 9) correspondant à des quantités d'acide glucuronique comprises entre 20 et 150  $\gamma$ : par exemple 0,5, 1,0 et 1,5  $\text{cm}^3$ , quantités correspondant respectivement à 50, 100

et 150  $\gamma$  d'acide glucuronique. On traite de la même façon 2 cm<sup>3</sup> d'eau qui fourniront l'extrait qui servira de solution de comparaison pour les lectures photométriques se rapportant à la droite d'étalonnage.

**Mesures photométriques.** On obtient donc dans chaque série de dosages une série d'extraits correspondant aux urines analysées et autant d'extraits fournis par les urines déglucuronidées correspondantes, plus les extraits fournis par les quantités connues de glucurone, et l'extrait fourni par l'eau. On mesure au moyen du photomètre de PULFRICH (filtre S 57; épaisseur 30 mm) l'extinction des extraits correspondant aux urines analysées, l'extrait fourni par la même urine déglucuronidée servant dans chaque cas de solution de comparaison placée dans l'autre cuvette du photomètre. Les extraits sont transférés dans les cuvettes au moyen d'une pipette. Les points obtenus pour les extraits correspondant aux quantités connues de glucurone, l'extrait fourni par l'eau distillé servant de solution de comparaison, permettent d'établir la droite d'étalonnage, passant par l'origine (voir fig. 2), correspondant aux conditions de la détermination. La droite d'étalonnage permet de calculer, à partir des valeurs de l'extinction lues au photomètre, les teneurs en glucuronoconjugués du type éther-oxyde, exprimées en acide glucuronique, des échantillons de

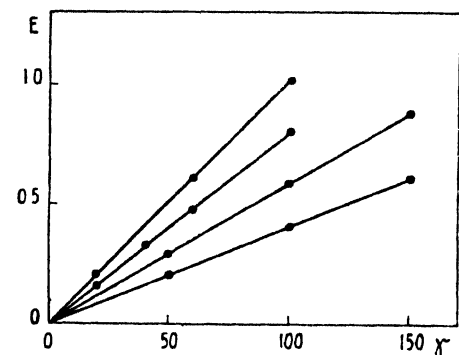


Fig. 2. Droites d'étalonnage. En abscisses: quantités de glucurone, exprimées en acide glucuronique. En ordonnées: valeurs de E pour une épaisseur de 30 mm. Solution de comparaison: l'extrait fourni par l'eau distillée traitée comme la solution de glucurone.

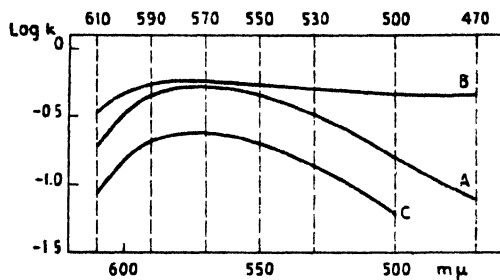


Fig. 1. Courbes de couleur typique. A: Solution aqueuse d'acide bornéolglucuronique (0,5 cm<sup>3</sup> de solution à 46 mgr p. 100 cm<sup>3</sup>), solution de comparaison: eau. B: urine, solution de comparaison: eau. C: urine, solution de comparaison: extrait fourni par l'urine hydrolysée.

filtrats de défécation de l'urine. Comme on a utilisé 2 cm<sup>3</sup> de filtrat et comme 62,5 cm<sup>3</sup> de filtrat correspondent à 20 cm<sup>3</sup> d'urine, il suffit de diviser la valeur obtenue par 0,64 pour obtenir la teneur en acide glucuronique conjugué sous la forme éther-oxyde de 1 cm<sup>3</sup> d'urine.

### Documents justificatifs.

**Nécessité de la purification de l'urine.** Si la réaction de TOLLENS selon le mode adopté par MAUGHAN, EVELYN et BROWNE<sup>18)</sup> est appliquée, comme dans la méthode de ces auteurs, à l'urine telle quelle, la courbe de couleur typique mesurée au photomètre n'est pas identique à celle que fournit une solution d'acide glucuronique traitée de la même façon. Les essais de récupération rapportés dans le Tableau I mettent en évidence l'existence, dans ces conditions, d'une forte erreur par excès.

TABLEAU I.

Réaction de TOLLENS, selon MAUGHAN, EVELYN et BROWNE, appliquée à l'urine telle quelle.

Acide glucuronique ajouté à l'urine ( $\gamma$ p. cm <sup>3</sup> )	Quantité récupérée	Acide glucuronique ajouté à l'urine ( $\gamma$ p. cm <sup>3</sup> )	Quantité récupérée
50	76	40	142
50	64	40	66

**Essai de défécation par l'acétate de plomb neutre, suivie d'une précipitation par l'acétate de plomb basique.** On sait que l'acide glucuronique et ses conjugués ne sont pas précipités par l'acétate de plomb neutre tandis qu'ils sont précipités par l'acétate de plomb

basique (P. MAYER et C. NEUBERG <sup>19</sup>). Cette précipitation résulte de la formation de glucuronate basique de plomb. L'application de la réaction de TOLLENS au précipité résultant de l'action de l'acétate basique de plomb sur l'urine, avec ou sans traitement préalable par l'acétate de plomb neutre, a été proposée déjà par différents auteurs (A. JOLLES <sup>14</sup>; H. ROGER <sup>32</sup>; A. W. VAN DER HAAR <sup>36</sup>; E. SPAETH <sup>34</sup>; C. NEUBERG et M. KOBEL <sup>20</sup>; H. B. SALT <sup>33</sup>; etc.). Nous avons tenté d'utiliser le procédé décrit par SALT en appliquant au précipité obtenu la méthode de dosage photométrique que nous avons adoptée. La courbe de couleur typique a été encore différente de celle que donne une solution d'acide glucuronique et les essais de récupération ont été très décevants. Nous n'avons retrouvé que 50 p. 100 environ de l'acide glucuronique ajouté à l'urine. Nous avons pu nous assurer par ailleurs, de ce que cette purification n'élimine pas les pentoses, comme le montre le fait que l'addition de faibles concentrations d'arabinose ou de xylose modifier la courbe de couleur typique. L'addition des mêmes pentoses à l'urine à la concentration de 1 p. 100 provoque en dépit de la purification tentée, une coloration noirâtre.

**Justification de la technique de purification adoptée.** a) La déglucidation. — Pour fixer les quantités de  $\text{CuSO}_4$  et de  $\text{Ca(OH)}_2$  à ajouter à l'urine, nous avons, le volume final étant amené à 50 cm<sup>3</sup>, fait l'essai de différentes proportions des réactifs et de l'urine et étudié la récupération de l'acide bornéolglucuronique ajouté.

Les résultats sont réunis dans le tableau II, qui justifie l'addition à 20 cm<sup>3</sup> d'urine, de 10 cm<sup>3</sup> de  $\text{CuSO}_4$  et de 10 cm<sup>3</sup> de  $\text{Ca(OH)}_2$ , le volume final étant finalement amené à 50 cm<sup>3</sup> dans un ballon jaugé. Dans ces conditions, comme nous l'avons vérifié, la récupération est satisfaisante et le précipité qui n'entraîne pas l'acide bornéolglucuronique enlève parmi différentes substances le glucose (jusqu'à concurrence de 20 gr. p. litre), les pentoses et l'acide glucuronique libre. Cependant la courbe de couleur typique diffère encore de celle que fournit l'acide glucuronique.

TABLEAU II.

Essai de déglucidation avec différentes quantités d'urine, de  $\text{CuSO}_4$  (Réactif 1) et de  $\text{Ca(OH)}_2$  (Réactif 2). Volume final amené à 50 cm<sup>3</sup>.

	Urine	$\text{CuSO}_4$	$\text{Ca(OH)}_2$	
1.	10 cm <sup>3</sup>	20 cm <sup>3</sup>	20 cm <sup>3</sup>	Proportions adoptées par D. D. VAN SLYKE <sup>37</sup> . Perte d'une partie de l'acide bornéolglucuronique ajouté.
2.	10 cm <sup>3</sup>	10 cm <sup>3</sup>	10 cm <sup>3</sup>	Perte d'une partie de l'acide bornéolglucuronique ajouté.
3.	20 cm <sup>3</sup>	10 cm <sup>3</sup>	10 cm <sup>3</sup>	Bonne récupération. Proportions adoptées. L'opération élimine le glucose urinaire jusqu'à concurrence de 20 gr. p. litre.

b. La défécation à l'acétate mercurique. Cette opération élimine l'indirubine qui intervient dans la coloration finale sous la forme d'une teinte rouge (R. BERNIER). Nous utilisons une solution à 25 p. 100 et nous en ajoutons 4 cm<sup>3</sup> aux 20 cm<sup>3</sup> de filtrat, puis nous amenons au volume de 25 cm<sup>3</sup>. Cette concentration est, comme nous l'avons vérifié, suffisante pour éliminer, lors du chauffage en milieu acide, l'apparition de la coloration rouge qui se développe si on n'a pas traité par l'acétate de mercure.

c. Le traitement par  $\text{H}_2\text{S}$ . Il est rendu nécessaire par le fait que, dans l'exécution de la réaction de coloration, lors du chauffage au bain-marie bouillant, il se produit dans les filtrats simplement déglucidés et déféqués par l'acétate mercurique un trouble qui rendrait imprécise la mesure photométrique. Le traitement par l'acide sulfhydrique, dont on élimine l'excès par un barbotage d'air, supprime cet inconvénient en précipitant le cuivre et le mercure en excès. Le précipité de sulfures est éliminé par la filtration sur papier SCHLEICHER et SCHÜLL 602 e h.

d. Caractères des filtrats obtenus après déglucidation, défécation à l'acétate mer-



curique, traitement par  $H_2S$  et filtration. Si on applique la réaction de coloration selon la technique proposée (en utilisant la solution de comparaison préparée à partir de l'urine hydrolysée, comme justifié ci-dessous) on obtient comme le montre la figure 1, la même courbe de couleur typique que celle fournie par une solution de glucuronide (acide bornéolglucuronique) traitée de la même manière. Les essais de récupération, faits avec l'acide bornéolglucuronique ont été satisfaisants comme le montre le tableau IV. Comme on devait s'y attendre, les glucuronoconjugués du type ester ne sont pas dosés. Ils sont en effet hydrolysés en milieu alcalin à la température du laboratoire et, lors de la déglucidation, le pH atteint une valeur supérieure à 11. L'acide glucuronique des conjugués du type ester est, dans ces conditions, libéré et éliminé avec le précipité. Nous avons vérifié que notre méthode ne dose ni l'acide benzoyleglucuronique, préparé selon la méthode de A. J. QUICK<sup>28</sup>), ni le glucuronoconjugué de l'acide acétylsalicylique, c'est à dire deux glucuronoconjugués du type ester. Nous avons observé qu'elle dose l'acide bornéolglucuronique, l'acide mentholglucuronique et l'acide pregnandiolglucuronique: trois glucuronoconjugués du type éther-oxyde. Nous croyons donc pouvoir dire que notre méthode dose les glucuronides seulement, c'est à dire l'acide glucuronique conjugué par le moyen de liaisons qui sont stables dans les conditions adoptées.

**Nécessité d'une solution de comparaison** préparée à partir de la même urine hydrolysée. Le principe de cette opération est le suivant: par l'hydrolyse chlorhydrique à la température de 100°, on libère de ses combinaisons la totalité de l'acide glucuronique et cet acide est précipité lors de la déglucidation de l'urine. L'opération revient donc à priver l'urine de la totalité de l'acide glucuronique, conjugué ou non, qu'elle contient. Comme le montre la figure 1, l'emploi d'une solution de comparaison préparée à partir de l'urine hydrolysée permet d'obtenir à partir de l'urine une courbe de couleur typique identique à celle de l'acide glucuronique.

**Technique de la réaction de TOLLENS.** 1. Essai d'un procédé finalement abandonné. Nous avons, à la suite de nombreux essais, adopté un procédé permettant de doser photométriquement l'acide glucuronique dans ses solutions pures (M. FLORKIN<sup>8</sup>)) (le procédé a encore été modifié par la substitution de l'éther au benzène comme solvant et par la filtration de la solution acétonique de naphtorésorcine) Si cette technique permet dans certains cas un dosage avec une approximation de 1—4 p. 100, elle est cependant irrégulière. On ne peut compter, d'une manière générale, que sur une approximation de 10 à 20 p. 100. Par ailleurs, le procédé est coûteux par la grande consommation de naphtorésorcine qu'il entraîne. Le degré de purification de la naphtorésorcine est aussi très important. Aussi avons-nous renoncé à cette technique.

2. Justification de la technique adoptée. Le procédé proposé par MAUGHAN, EVELYN et BROWNE<sup>48</sup>) est plus rapide et plus précis. Il est aussi beaucoup plus économique par la petite consommation de naphtorésorcine qu'il entraîne. Le degré de pureté de la naphtorésorcine a aussi moins d'importance. Nous avons avec la naphtorésorcine Kodak de point de fusion = 120°, obtenu d'aussi bons résultats qu'avec la préparation la plus pure qu'on trouve dans le commerce, celle de HOFFMANN-LA ROCHE, de point de fusion = 122—123°.

**Mesure photométrique.** Le choix du filtre S 57 du photomètre de PULFRICH est justifié par la figure 1. Nous avons vérifié que dans les conditions adoptées, la loi de BEER est vérifiée. Comme le montre la figure 2, la relation entre les valeurs de l'extinction (épaisseur 30 mm, filtre S 57) et les teneurs en acide glucuronique est en effet, représentée graphiquement par une droite passant par l'origine. Les quantités d'acide glucuronique dosées dans les limites d'utilisation précise du photomètre sont comprises entre 20 et 150  $\gamma$ . La position de la droite d'étalonnage doit être déterminée chaque fois, car elle varie d'une expérience à l'autre (figure 2). L'utilisation d'une solution de glucurone pour l'établissement de la droite d'étalonnage est avantageuse du fait que la glucurone se trouve dans le commerce sous une forme suffisamment pure, ce qui n'est pas le cas pour l'acide glucuronique. La solution de glucurone utilisée, qui a une concentration de 9,07 mg p. 100  $cm^3$ , correspond à une solution d'acide glucuronique à 100  $\gamma$  par  $cm^3$ . Il est commode, pour établir la droite d'étalonnage, d'en utiliser, par exemple, 0,5, 1,0 et 1,5  $cm^3$ , ou même deux de ces quantités seulement. Le bien fondé du remplacement de l'acide glucuronique par la glucurone, sa lactone, est montré par les résultats réunis dans le

Tableau III: valeurs identiques de l'extinction pour des concentrations correspondantes et même courbe de couleur typique.

TABLEAU III.

Concentration (en acide glucuronique)	Valeurs de E pour les différents filtres spectraux						
	S 47	S 50	S 53	S 55	S 57	S 59	S 61
Glucurone							
20 $\gamma$	0	0,08	0,1	0,12	0,16	0,145	0,055
40 $\gamma$	0,015	0,09	0,23	0,29	0,33	0,31	0,13
150 $\gamma$	0,12	0,32	0,78	0,97	1,14	1,05	0,475
Acide bornéolglucuronique							
20 $\gamma$	0	0,02	0,1	0,13	0,16	0,15	0,06
40 $\gamma$	0,015	0,08	0,235	0,30	0,355	0,335	0,16
150 $\gamma$	0,13	0,34	0,77	0,98	1,14	1,05	0,485

**Degré de précision de la méthode.** Les essais de récupération résumés dans le tableau IV montrent que la précision des résultats obtenus par la méthode est très satisfaisante. Comme nous l'avons dit, on ne dose que les glucuronides, et non les glucuronoconjugués de type ester, ni l'acide glucuronique libre. Les pentoses, le glucose (jusqu'à 20 gr. par litre) et, comme nous l'avons vérifié, l'acide ascorbique, ne gênent pas l'exécution du dosage. Appliquée à des urines nyctémérales d'hommes normaux, la méthode a fourni des valeurs comprises entre 50 et 200  $\gamma$  par  $\text{cm}^3$ , d'acide glucuronique conjugué sous la forme éther-oxyde (glucuronides).

TABLEAU IV.

Essais de récupération, par la méthode adoptée..

Quantité d'acide bornéol-glucuronique ajoutée à l'urine (en $\gamma$ d'acide glucuronique)	Quantité récupérée	Quantité d'acide bornéol-glucuronique ajoutée à l'urine (en $\gamma$ d'acide glucuronique)	Quantité récupérée.
80	77	40	38
50	50	40	35
100	95		

### III. Dosage des glucuronides sanguins.

On sait combien stériles ont été jusqu'à présent les essais de dosage des glucuronides du sang. Ce n'est qu'à titre documentaire qu'il y a lieu de rappeler les tentatives de LEPINE et BOULUD<sup>15)</sup> qui cherchaient à déterminer la teneur du sang en acide glucuronique en comparant les pouvoirs rotatoires du sang avant et après fermentation par la levure. Il en est de même des essais de S. L. ORSKOV<sup>22)</sup> qui extrait une partie des glucuronoconjugués du sang par l'éther et mesure ensuite le pouvoir réducteur de l'extrait par la méthode de HAGEDORN et JENSEN. Les autres auteurs qui se sont occupés de la question se sont contentés d'une mise en évidence qualitative des glucuronoconjugués.

A première vue, l'adaptation du dosage photométrique à l'étude du sang ne paraît soulever aucune difficulté particulière. En effet, le procédé est utilisable en présence de glucose. Une opération supplémentaire doit évidemment être ajoutée: il faut préalablement séparer les globules sanguins et déprotéiniser le plasma. Cette opération est effectuée très simplement, sans dilution ni addition de réactifs, par ultrafiltration du sang total.

**Ultrafiltration.** Elle se fait au moyen de l'ultrafiltre métallique à haute pression et à balai intérieur de L. BRULL<sup>2)</sup>. On introduit dans l'appareil 20 cm<sup>3</sup> de sang défibriné. Après quelques heures d'ultrafiltration sous 10 atmosphères de pression, on obtient un liquide limpide et dépourvu de protéines. Il faut prendre soin d'éliminer les premières gouttes qui s'écoulent du filtre et qui peuvent, avant colmatage de la membrane, contenir des traces de protéines. L'opération s'effectue dans une chambre froide à 0°, ce qui évite l'hydrolyse des glucuronides.

**Préparation du filtrat de défécation.** Dans un ballon jaugé de 10 cm<sup>3</sup>, on pipette 4 cm<sup>3</sup> d'ultrafiltrat. On ajoute 2 cm<sup>3</sup> de la solution de sulfate cuivrique, puis 2 cm<sup>3</sup> de la suspension d'hydroxyde calcique. On amène au trait de jauge avec de l'eau distillée, on mélange, on abandonne pendant une demi-heure en agitant fréquemment, puis on centrifuge. On verse alors 6,6 cm<sup>3</sup> du liquide dans un tube gradué et on complète le volume à 8 cm<sup>3</sup> au moyen d'une solution d'acétate mercurique à 25 p. 100. On centrifuge de nouveau, on recueille le liquide séparé du précipité et on le traite par un courant gazeux d'acide sulfhydrique. On filtre sur un filtre durci (SCHLEICHER et SCHÜLL 602 e h) pour enlever le précipité de sulfures. On élimine enfin l'excès d'acide sulfhydrique par barbotage d'air. La purification est terminée. Il ne reste plus qu'à effectuer la réaction de coloration.

**Préparation de la solution de comparaison.** Elle est constituée par l'ultrafiltrat sanguin dont on a, au préalable, hydrolysé les glucuronosconjugués. L'acide glucuronique libéré est éliminé avec le glucose et les pentoses au cours des opérations de purification. On procède comme suit: dans un ballon de 10 cm<sup>3</sup>, on pipette aussi 4 cm<sup>3</sup> d'ultrafiltrat, mais avant d'ajouter les réactifs déglucidants, on introduit 1 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique (D: 1,19, dilué deux fois). On porte au bain-marie bouillant pendant une demi-heure. Après neutralisation de l'acide chlorhydrique par une quantité équivalente de soude concentrée, on traite le filtrat point par point comme l'échantillon à doser.

**Réaction de coloration et mesure photométrique.** Ces opérations s'effectuent point par point comme pour le dosage des glucuronides urinaires, sur 2 cm<sup>3</sup> de filtrat de défécation. On utilise aussi le filtre S 57, et on établit également, dans chaque série de déterminations, la position de la droite d'étalement en utilisant une solution-étalon de glucurone.

**Sensibilité et degré de précision de la méthode.** Les quantités d'acide glucuronique sous forme de glucuronide, dosées par la méthode photométrique dans les limites d'utilisation précise du photomètre de PULFRICH, correspondent, lorsqu'on utilise la cuvette la plus épaisse (30 mm) à un minimum de 20 γ pour les 2 cm<sup>3</sup> de filtrat utilisés. Etant donnée la dilution de ce filtrat de défécation par rapport au plasma, le minimum dosable est de 80 mgr. d'acide glucuronique (sous forme de glucuronide) par litre. La méthode appliquée au sang normal ne donne pas de résultat. Le plasma contient donc, par litre, moins de 80 mgr. d'acide glucuronique sous forme de glucuronides, alors que l'urine en contient 50—200 mgr. par litre.

La méthode peut servir à doser les glucuronides dans le sang d'un animal qui a absorbé des quantités suffisantes d'une substance glucuronogénique. C'est ce que nous avons vérifié dans deux essais après administration à des lapins, au moyen d'une sonde oesophagienne, de 2 gr. de menthol en suspension dans 20 cm<sup>3</sup> d'une solution gommeuse à 10 p. 100. Après 2—3 heures, le sang de ces animaux contenait, dans un cas 92 mgr. par litre et dans l'autre 66 mgr. par litre d'acide glucuronique sous forme de glucuronides. Le degré de précision des dosages n'est d'ailleurs que de l'ordre de 10 p. 100, comme le montre le tableau ci-contre, résumant deux essais de récupération d'acide bornéolglucuronique ajouté à du sang de chacun des deux lapins de l'expérience qui vient d'être citée (Tableau V).

TABLEAU V.

	Teneur du sang en acide glucuro- nique sous forme de glucuronides mgr. p. litre	Acide gluco- ronique ajouté sous forme de glucuronide mgr. p. litre	Quantité totale trouvée mgr. p. litre
1er essai	92	50	127
2d essai	66	100	151

#### IV. Dosage de l'acide pregnandiolglucuronique urinaire.

L'acide pregnandiolglucuronique, produit d'élimination de la progestérone, apparaît dans l'urine de la femme, et sa concentration y augmente à chaque phase d'activité du corps jaune: au cours de la phase lutéinique du cycle menstruel<sup>(41)</sup> et au cours de la grossesse<sup>(3)</sup>. On saisit donc l'intérêt de l'étude des variations de l'excrétion urinaire de cette substance. E. H. VAN-

NING <sup>39, 40</sup>) a récemment mis au point une méthode permettant de doser l'acide pregnandiol-glucuronique dans l'urine. Cette méthode consiste à extraire le glucuronide au moyen d'alcool butylique, puis à purifier l'extrait jusqu'à obtention d'un produit cristallin qui peut être pesé après dessiccation. La méthode gravimétrique de VENNING présente différents inconvénients:

1. l'échantillon analysé devant contenir 10 à 15 mgr. du glucuronide, il est nécessaire de manipuler de grandes quantités d'urine: 200 cm<sup>3</sup> à 9 mois de grossesse, 1 litre à 3 mois;

2. le résultat du dosage est entaché d'une erreur souvent considérable: l'erreur minima accusée par les essais de récupération est de 15 p. 100 par défaut, résultant des nombreuses opérations d'extraction et de purification. L'erreur par défaut est en partie compensée par une erreur par excès résultant de l'imperfection de la purification de la substance qui subit la pesée.

L'acide pregnandiolglucuronique étant un glucuronide, nous avons fait son dosage en combinant l'extraction butylique avec un dosage photométrique portant sur l'extrait obtenu. Nos essais ont porté sur des urines de femmes dont la grossesse était presque à terme. Le dosage se fait sur 40 cm<sup>3</sup> d'urine, quantité 5 fois moindre que celle exigée pour l'application de la méthode de VENNING. Les résultats trouvés ont d'ailleurs été voisins de ceux obtenus par cet auteur. Trois dosages ont fourni des valeurs correspondant respectivement à une excrétion de 70, de 84 et de 78 mgr. d'acide pregnandiolglucuronique en 24 heures.

**Réactifs.** Aux réactifs décrit dans la deuxième partie du présent mémoire, il faut ajouter: de l'alcool butylique et une solution décinormale de soude.

**Préparation d'un filtrat de défécation.** Dans un ballon jaugé de 100 cm<sup>3</sup>, on met 40 cm<sup>3</sup> d'urine filtrée, 20 cm<sup>3</sup> de la solution de sulfate cuivrique, 20 cm<sup>3</sup> de la suspension d'hydroxyde calcique et de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. On mélange puis on abandonne pendant une demi-heure, en agitant fréquemment. On sépare le précipité par centrifugation et on prélève 70 cm<sup>3</sup> du liquide, auxquels on ajoute 14 cm<sup>3</sup> d'acétate mercurique à 25 p. 100. On centrifuge et on sépare le liquide qu'on traite par un courant d'acide sulfhydrique puis qu'on filtre sur un papier durci (602 e h de SCHLEICHER et SCHÜLL). On chasse enfin par barbotage d'air l'excès d'acide sulfhydrique.

**Extraction à l'alcool butylique.** On verse 60 cm<sup>3</sup> du filtrat de défécation dans un grand tube de centrifugeuse. On ajoute 15 cm<sup>3</sup> d'alcool butylique. On mélange les deux liquides avec un agitateur, puis on les sépare par centrifugation. L'alcool butylique qui forme la couche supérieure est facilement pipeté. On répète trois fois l'opération en employant chaque fois 15 cm<sup>3</sup> d'alcool butylique. Les 60 cm<sup>3</sup> d'extrait butylique sont réunis dans un ballon à fond rond et à tubulure latérale. Ce ballon est adapté à un autre ballon de même forme, selon le schéma bien connu, décrit notamment par VAN SLYKE et KIRK <sup>38</sup>). On constitue de cette manière un appareil à distillation dans le vide qui, adapté à une bonne trompe à eau, permet d'évaporer l'alcool butylique à une température oscillant entre 30 et 45°. On obtient finalement un résidu amorphe blanchâtre qu'on extrait cinq fois avec chaque fois 2 cm<sup>3</sup> de soude décinormale. Les extraits successifs sont réunis dans un ballon jaugé de 10 cm<sup>3</sup>. On ajoute quelques gouttes de soude pour atteindre le trait de jauge. Le liquide obtenu est limpide et à peine jaunâtre. Deux cm<sup>3</sup> de ce liquide vont servir à opérer la réaction de coloration et la mesure photométrique.

**Réaction de coloration et mesure photométrique.** Ces opérations s'opèrent point par point selon le procédé précédemment décrit. Il est nécessaire de posséder une solution de comparaison. On la prépare en hydrolysant 40 cm<sup>3</sup> d'urine par addition de 10 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique (D: 1,19, dilué deux fois) et chauffage au bain-marie bouillant pendant une demi-heure. Après neutralisation de l'acide par une quantité équivalente de soude concentrée, on traite cette urine comme l'échantillon à doser. Il faut aussi établir pour chaque série de dosages la position de la droite d'étalonnage en utilisant une solution-étalon de glucurone.

### Documents justificatifs.

**Purification préalable de l'urine.** La purification préalable de l'urine accroît la spécificité de la méthode en éliminant des substances qui interfèrent avec le dosage. Elle facilite aussi l'extraction butylique: au cours de l'extraction il ne se forme pas cette émulsion gênante qui apparaît quand on traite l'urine telle quelle, selon la technique de VENNING. D'autre part, l'extrait butylique est à peine coloré, alors qu'il est franchement jaune dans la technique de VENNING.

**Spécificité de la méthode.** Les glucuronides banaux sont insolubles dans l'alcool butylique et ne sont par conséquent pas dosés par la méthode. En effet, l'urine de femme non gravide, en période folliculaire, donne dans les conditions décrites ci-dessus, des résultats totalement négatifs.

Toutefois la méthode n'est pas entièrement spécifique. L'acide oestriolglucuronique est aussi soluble dans l'alcool butylique. Mais la teneur de l'urine en oestriol est beaucoup plus faible que sa teneur en pregnandiol. Par ailleurs, une partie seulement de l'oestriol urinaire est sous forme de glucuronide. L'erreur causée par la présence de l'acide oestriolglucuronique est faible.

### V. Mesure de l'activité $\beta$ -glucuronidasique.

On a pu mettre en évidence, dans différents tissus de Mammifères, un ferment hydrolysant les glucuronides et qui a reçu le nom de  $\beta$ -glucuronidase (H. MASAMUNE<sup>17</sup>; G. OSHIMA<sup>23, 24</sup>). Sa distinction d'avec la  $\beta$ -glucosidase n'est pas encore certaine, bien qu'il y ait des arguments en sa faveur (B. HELFERICH et G. SPARMBERG<sup>12</sup>). W. H. FISHMAN<sup>6</sup>) a décrit une méthode de préparation et de purification de la glucuronidase de la rate de boeuf et il a étudié quelques aspects de sa cinétique<sup>(7)</sup>. Nous avons étudié les conditions dans lesquelles peut être mesurée l'activité des solutions de glucuronidase (enzyme de la rate de boeuf, préparation selon FISHMAN).

Au pH 4,4, et pour une concentration finale de 0,025 M de substrat, ce dernier étant le bornéolglucuronate de Na (conditions optimales déterminées par FISHMAN), nous avons recherché l'influence de la durée de l'hydrolyse et observé qu'il existe une proportionnalité entre la quantité de substrat hydrolysé et la durée de l'action, pour autant que la quantité hydrolysée ne dépasse pas 5 p. 100 de la quantité totale de glucuronide. Par ailleurs, nous avons observé qu'il y a, pour un temps d'action donné, proportionnalité entre la quantité de substrat hydrolysé et la quantité d'enzyme, pour autant que l'hydrolyse ne dépasse pas 5 p. 100. Nous proposons donc d'appeler „*unité glucuronidasique*” la quantité d'enzyme qui, dans les conditions que nous avons adoptées, (1 cm<sup>3</sup> d'enzyme + 1 cm<sup>3</sup> de tampon pH 4,4, d'acide acétique-acétate, 2 M + 2 cm<sup>3</sup> de bornéolglucuronate de Na 0,05 M, temp. 38°) hydrolyse en trente minutes 5 p. 100 de la quantité totale de substrat. L'acide glucuronique libéré après 30 minutes est dosé par le procédé décrit par W. H. FISHMAN<sup>6, 7</sup>) après déprotéinisation trichloracétique, et au moyen de sulfate cérrique 0,002 N. Si l'hydrolyse dépasse 5 p. 100, l'enzyme doit être dilué en vue d'un nouvel essai ou un temps d'action plus court doit être adopté.

**Influence de la concentration en substrat.** On mélange: A. 1 cm<sup>3</sup> d'enzyme, 1 cm<sup>3</sup> de tampon d'acide acétique-acétate 0,4 M, pH 4,4, et 2 cm<sup>3</sup> de bornéolglucuronate de Na 0,005 M (concentration finale 0,0025 M)

B. 1 cm<sup>3</sup> d'enzyme, 1 cm<sup>3</sup> de tampon et 2 cm<sup>3</sup> de bornéolglucuronate de Na 0,05 M (concentration finale 0,025 M)

A'. Les mêmes solutions qu'en A, sauf que la solution de ferment a été chauffée pendant 30 minutes à 100°.

B'. Les mêmes solutions qu'en B, mais en utilisant le ferment inactivé comme en A'.

Après une heure au thermostat à 38°, dosage de l'acide glucuronique libéré:

$$A-A' = 60 \gamma \text{ ou } 3,11 \text{ p. } 100.$$

$$B-B' = 960 \gamma \text{ ou } 4,98 \text{ p. } 100.$$

Nous avons adopté la concentration finale 0,025 M, qui est d'ailleurs donnée comme optimale par W. H. FISHMAN<sup>7</sup>).

**Influence de la durée de l'hydrolyse.** On mélange 3 cm<sup>3</sup> d'enzyme, 3 cm<sup>3</sup> de tampon et 6 cm<sup>3</sup> de bornéolglucuronate de Na 0,05 M et 10 gouttes de toluène. Les réactifs ont été placés avant le mélange au bain à 38° et mélangés après avoir atteint cette température. Au cours du séjour du mélange au thermostat à 38°, des échantillons de 2 cm<sup>3</sup> ont été prélevés aux temps 0, 30, 60, 90 et 120 minutes, pour le dosage de l'acide glucuronique libéré. Un témoin fait en remplaçant l'enzyme par de l'enzyme inactivé par chauffage n'a pas montré d'hydrolyse en l'espace de 120 minutes. La quantité d'acide glucuronique libéré est donnée par la différence entre la réduction à un temps donné et la réduction au temps 0.

TABLEAU VI.

Temps en minutes	Acide glucuronique libéré ( $\gamma$ )	Hydrolyse p. 100
30	180	1,87
60	355	3,68
90	535	5,66
120	680	7,07
240	1150	11,94

Comme le montre la figure 3, il y a donc proportionnalité entre la quantité transformée et la durée de l'hydrolyse pour autant que la quantité transformée ne dépasse pas une valeur comprise entre 5 et 7 p. 100 de la quantité totale (Tableau VI).

**Influence de la concentration de l'enzyme.** On fait quatre mélanges constitués par l'addition à 1 cm<sup>3</sup> de tampon + 2 cm<sup>3</sup> de bornéolglucuronate de 1 cm<sup>3</sup> d'enzyme respectivement dilué 2 fois, dilué quatre fois, dilué 8 fois et non dilué. Après un séjour de 30 minutes au thermostat à 38°, le degré d'hydrolyse est, pour chaque mélange, fourni par la différence de pouvoir réducteur entre ce mélange et un mélange témoin dans lequel les 2 cm<sup>3</sup> de bornéolglucuronate ont été remplacés par 2 cm<sup>3</sup> d'eau.

TABLEAU VII.

Dilution de l'enzyme	Acide glucuronique libéré ( $\gamma$ )	Hydrolyse p. 100
1/8	215	1,1
1/4	450	2,33
1/2	860	4,46
1	1480	7,77

Comme le montre la figure 4, la proportionnalité est maintenue entre quantité de substrat hydrolysé et concentration en enzyme pour autant que cette quantité ne dépasse pas une valeur comprise entre 5 et 7 p. 100 de la quantité totale de substrat (Tableau VII).

## VI. Synthèse enzymatique de l'acide bornéolglucuronique.

Notre méthode photométrique de dosage des glucuronides convient particulièrement aux expériences relatives à la synthèse enzymatique des glucuronides car elle permet de doser ces derniers en présence d'acide glucuronique libre. Elle permet donc de mesurer l'éventuelle formation de glucuronides dans un milieu contenant une substance glucuronogénique, de l'acide glucuronique et de la glucuronidase. Une telle recherche implique cependant la déprotéinisation du mélange avant le dosage. Nous avons vainement essayé de faire précéder ce dernier d'une déprotéinisation par voie chimique. Parmi les déprotéinisants dont nous avons fait l'essai, l'acide trichloracétique donne déjà par lui-même, dans les conditions du dosage photométrique, une coloration rouge pourpre intense. L'acétate mercurique et le sulfate de cuivre associé à

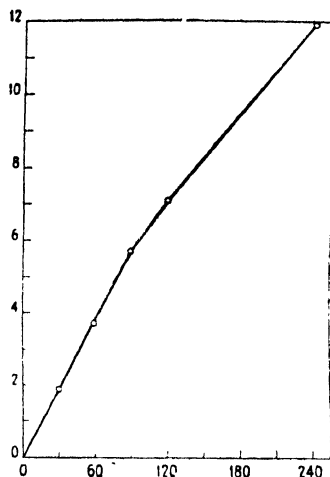


Fig. 3. Hydrolyse du bornéolglucuronate de Sodium par la glucuronidase, en fonction des temps d'action. En abscisses, les temps en minutes. En ordonnées, les pourcentages d'hydrolyse.

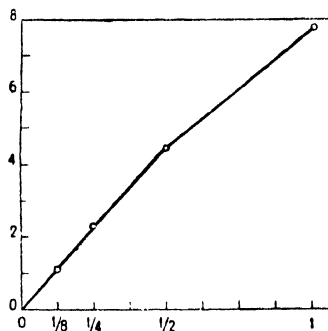


Fig. 4. Influence de la dilution de l'enzyme sur l'hydrolyse du bornéolglucuronate de Sodium par la glucuronidase. En abscisses, les dilutions. En ordonnées, les pourcentages d'hydrolyse.

l'hydroxyde calcique entraînent une perte considérable de glucuronide. Quand on emploie l'acétate d'urane, on observe l'entraînement total, dans le précipité de protéines, de la totalité du glucuronide ajouté. Nous faisons par conséquent la déprotéinisation par ultrafiltration sous pression (ultrafiltres de THYSEN, membranes „eiweissdicht" de Membranfilter). Nous avons ainsi pu mettre en évidence, dans les conditions précisées plus loin, une synthèse de glucuronide après avoir mis en présence in vitro du bornéol, de l'acide glucuronique libre et de la glucuronidase en milieu tamponné au pH 4.5.

Quant à savoir si cette synthèse enzymatique correspond au mécanisme réalisé in vivo, c'est évidemment une autre affaire. FISHMAN<sup>5)</sup> rapporte que la teneur en glucuronidase des organes du chien augmente quand on fait ingérer à l'animal de grandes quantités de bornéol, ce qui suggère selon lui la possibilité d'une intervention synthétisante de l'enzyme. Par contre, dans leurs études sur la formation de glucuronoconjugués en présence de coupes de tissus de Mammifères, W. L. LIPSCHITZ et E. BUEDING<sup>16)</sup> ont bien observé une glucuronoconjugaison après avoir mis en présence de coupes de tissus de l'acide glucuronique et un alcool ou un phénol, mais cette conjugaison est, selon ces auteurs, très faible en comparaison de la production de glucuronoconjugués qu'ils ont observée lorsque l'acide glucuronique était remplacé par des corps en C<sub>3</sub> tels que l'acide pyruvique ou l'acide lactique. Pour ces auteurs, la glucuronoconjugaison commencerait par la formation de triosides, à partir desquels se formerait ensuite le glucuronide. Quant à savoir laquelle de ces vues exprime la nature du mécanisme régnant in vivo, il faudra de nouvelles expériences pour en décider.

**Documents expérimentaux.** 1. On met à l'étuve à 37°, dans un ERLÉNMEYER couvert au moyen d'un petit entonnoir: 25 cm<sup>3</sup> de  $\beta$ -glucuronidase de rate de boeuf (préparée selon une modification de la méthode de FISHMAN, activité: 1,1 unités par cm<sup>3</sup>), 60 mgr. d'acide glucuronique, 2 cm<sup>3</sup> de tampon d'acide acétique-acétate 2 M, de pH 4,5, 3 cm<sup>3</sup> de solution saturée de bornéol et un cristal de cette substance. Une prise de 6 cm<sup>3</sup> est faite après le mélange des réactifs et une autre 28 heures après. Aussitôt après leur prélèvement, ces échantillons sont soumis à l'ultrafiltration sous pression. On report l'ultrafiltrat dans un tube gradué. Quand le volume de liquide y atteint 2,5 cm<sup>3</sup>, on y ajoute 1 cm<sup>3</sup> de solution de CuSO<sub>4</sub> et 1 cm<sup>3</sup> de suspension de Ca(OH)<sub>2</sub> et de l'eau jusqu'au volume de 5 cm<sup>3</sup>. On filtre. Dans le filtrat placé dans un tube de centrifugeuse on fait passer un courant de H<sub>2</sub>S, on centrifuge et on prélève 2 cm<sup>3</sup> de liquide sur lesquels, après un barbotage d'air, on dose l'acide glucuronique conjugué selon la méthode photométrique. Comme liquide de comparaison pour la lecture photométrique, on emploie l'extrait fourni par le traitement d'un échantillon d'eau, lequel sert de liquide de comparaison pour l'établissement de la droite d'étalonnage. L'expérience a montré en effet que dans la région des lectures photométriques comprise entre 470 et 610 m $\mu$ , cet extrait est identique à celui fourni par le mélange des réactifs utilisés dans l'expérience, lorsqu'on hydrolyse ce dernier avant la déglucidation, c'est à dire que si on compare au photomètre l'extrait fourni par le milieu d'expérience déglucuronidé avec celui fourni par l'eau, la valeur de l'extinction est nulle dans la région considérée.

Teneur en glucuronides (en acide glucuronique) des 30 cm<sup>3</sup> du mélange:

au début de l'expérience	0
après 28 heures	2,64 mgr.

2. Mêmes conditions, mais 30 cm<sup>3</sup> de glucuronidase (préparée selon la méthode de FISHMAN jusqu'au stade appelé I par cet auteur; activité: 1,1 unités par cm<sup>3</sup>) + 70 mgr. d'acide glucuronique + 3 cm<sup>3</sup> de tampon + 3 cm<sup>3</sup> de solution saturée de bornéol + un cristal de ce corps.

Teneur en glucuronide (en acide glucuronique) des 35 cm<sup>3</sup> du mélange:

au début de l'expérience	0
après 24 heures	indosable
après 4 jours	1,57 mgr.
après 6 jours	2,11 mgr.

3. Mêmes conditions, mais 10 cm<sup>3</sup> d'enzyme (préparé selon FISHMAN jusqu'au stade H, activité 0,3 unité par cm<sup>3</sup>) + 25 mgr. d'acide glucuronique + 0,5 cm<sup>3</sup> de tampon + 2 cm<sup>3</sup> de solution saturée de bornéol + un cristal de cette substance.

Teneur en glucuronide (en acide glucuronique) des 12,5 cm<sup>3</sup> du mélange

au début de l'expérience	0
après 4 jours	0,58 mgr.

4. Mêmes conditions, mais 15 cm<sup>3</sup> d'enzyme (préparé selon FISHMAN jusqu'au stade I, activité 0,4 unité par cm.) + 40 mgr d'acide glucuronique + 3 cm<sup>3</sup> de tampon 0,4 M pH 4,4 + 2 cm<sup>3</sup> de la solu-

tion saturée de bornéol + un cristal de cette substance. Simultanément on a fait un mélange témoin différent du mélange ci dessus par le remplacement de l'enzyme par ce même enzyme chauffé à 100° pendant 30 minutes. Les dosages sont faits en utilisant comme solution de comparaison l'extrait fourni par un prélèvement simultané du témoin identiquement traité comme l'essai.

Teneur en glucuronide (en acide glucuronique) des 20 cm<sup>3</sup> du mélange:

après 4 jours 0  
après 7 jours 0,40 mgr.  
après 11 jours 0,67 mgr.

5. Mêmes conditions qu'en 3, mais 30 cm<sup>3</sup> d'une solution de glucuronidase de rate de boeuf spontanément inactivée et ayant été laissée pendant plusieurs semaines à la température du laboratoire (activité: 0) + 70 mgr. d'acide glucuronique + 1,5 cm<sup>3</sup> de tampon + 3,5 cm<sup>3</sup> de bornéol + un cristal de ce corps. La teneur en glucuronide a été trouvée égale à 0 au début, après 3 jours, après 6 jours et après 9 jours.

6. Mêmes conditions qu'en 3, mais en remplaçant les 10 cm<sup>3</sup> de l'enzyme par 10 cm<sup>3</sup> de la solution de bornéol. La teneur en glucuronide a été trouvée égale à 0 au début, après 4 jours et après 7 jours.

1) R. Bernier, Sur la présence de l'acide glucuronique et de certains hydrates de carbone dans l'urine normale, Thèse, Paris, 1910. — 2) L. Brull, C. R. Soc. Biol. **120**, 98 (1935). — 3) J. S. L. Browne, J. S. Henry, E. M. Venning, JI. of clin. invest. **16**, 678 (1937). — 4) M. Chambon, Acide glycuronique et glycuronoconjugaison, Thèse, Lyon, 1934. — 5) W. H. Fishman, JI. of Biol. Chem. **123**, XXXVI (1938). — 6) W. H. Fishman, JI. of Biol. Chem. **127**, 367 (1939). — 7) W. H. Fishman, JI. of Biol. Chem. **131**, 225 (1939). — 8) M. Florkin, C. R. Soc. Biol. **126**, 916 (1937). — 9) E. Fromm, P. Clemens, Zs. physiol. Chem. **34**, 385 (1902). — 10) O. Furth, K. Peschek, Bioch. Zs. **287**, 365 (1936). — 11) W. F. Goebel, F. H. Babers, JI. of Biol. Chem. **100**, 573 (1933). — 12) B. Helferich, G. Sparmberg, Zs. physiol. Chem. **221**, 92 (1933). — 13) H. H. Hildebrandt, Bioch. Zs. **21**, 1 (1909). — 14) A. Jolles, Zs. physiol. Chem. **81**, 203 (1912). — 15) R. Lépine, Boulud, C. R. **134**, 389 (1902). — 16) W. L. Lipschitz, E. Bueding, JI. of Biol. Chem. **129**, 333 (1939). — 17) H. Masamune, JI. of Bioch. (Jap.), **19**, 353 (1934). — 18) G. B. Maughan, K. A. Evelyn, J. S. L. Browne, JI. of Biol. Chem. **126**, 567 (1938). — 19) P. Mayer, C. Neuberg, Zs. physiol. Chem. **29**, 256 (1900). — 20) C. Neuberg, M. Kobel, Bioch. Zs. **243**, 435 (1931). — 21) C. Neuberg, W. Neimann, Zs. physiol. Chem. **44**, 127 (1905). — 22) S. L. Orskov, Skand. Arch. Phys. **63**, 255 (1931). — 23) G. Oshima, JI. of Bioch. (Jap.) **20**, 1361 (1934). — 24) G. Oshima, JI. of Bioch. (Jap.) **23**, 305 (1936). — 25) N. C. Pervier, R. A. Gortner, Ind. Eng. Chem. **15**, 1167 (1923). — 26) J. Pryde, R. T. Williams, Biochem. JI. **27**, 1197 (1923). — 27) A. J. Quick, JI. of Biol. Chem. **61**, 667 (1924). — 28) A. J. Quick, JI. of Biol. Chem. **69**, 549 (1926). — 29) A. J. Quick, JI. of Biol. Chem. **74**, 331 (1927). — 30) A. J. Quick, JI. of Biol. Chem. **98**, 537 (1932). — 31) G. E. Roe, JI. of Biol. Chem. **73**, 599 (1927). — 32) H. Roger, C. R. Soc. Biol. **78**, 314 (1915). — 33) H. B. Salt, Biochem. JI. **29**, 2705 (1935). — 34) E. Spaeth, Chemische Untersuchung des Harns, 1924, p. 250. — 35) C. Tollens, Zs. physiol. Chem. **61**, 95 (1909). — 36) A. W. van der Haar, Bioch. Zs. **88**, 205 (1918). — 37) D. D. van Slyke, JI. of Biol. Chem. **82**, 455 (1917). — 38) J. P. Peters, D. D. van Slyke, Quantitative clinical Chemistry, II, 1932, p. 928. — 39) E. M. Venning, JI. of Biol. Chem. **119**, 473 (1937). — 40) E. M. Venning, JI. of Biol. Chem. **126**, 595 (1938). — 41) E. M. Venning, J. S. L. Browne, Amer. JI. Phys. **119**, 417 (1937).



## Existe-t-il une mutase des glycérophosphates?

PAR

J. COURTOIS ET P. BIGET

(Labor. de Chimie biol. et Hydrol. de la Faculté de Pharmacie de Paris)

(22.VII.41.)

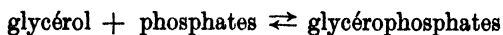
On sait que de multiples diastases agissent sur les esters phosphoriques: phosphatases, déshydrogénases, aldolase et mutases (J. COURTOIS <sup>1</sup>). Deux de ces mutases ont une action tout à fait remarquable: elles font émigrer la liaison ester sur un autre atome de carbone. Ces diastases sont la phosphoglycéromutase de MEYERHOF et KIESSLING <sup>2</sup>) qui isomérisé réversiblement l'acide phospho-3-glycérique en acide phospho-2-glycérique, et la phosphoglucomutase de CORI et COLOWICK <sup>3</sup>) qui transforme irréversiblement le phospho-1-glucopyranose (ester de CORI) en phospho-6-glucopyranose (ester de ROBISON). Nous nous sommes proposés de rechercher s'il existait une mutase similaire des  $\alpha$ - et  $\beta$ -glycérophosphates. Divers faits pouvaient en effet être interprétés en faisant intervenir une telle mutase.

MEYERHOF c.s. <sup>4</sup>) ont montré que par suite d'une oxydo-réduction fermentaire entre l'acide  $\alpha$ -glycérophosphorique et l'acide pyruvique apparaissaient l'acide dioxyacétonephosphorique et l'acide lactique. L'acide  $\beta$ -glycérophosphorique ne peut remplacer son isomère dans cette oxydo-réduction.

Par la suite GODA <sup>5</sup>) effectua de nouvelles recherches dans le laboratoire de MEYERHOF. Il observa que certaines préparations fermentaires du muscle pouvaient oxyder l'acide  $\beta$ -glycérophosphorique en présence d'acide pyruvique. GODA supposa qu'une mutase des glycérophosphates intervenait dans cette réaction, il ne put toutefois la mettre en évidence. Le  $\beta$ -glycérophosphate ne possédant pas de fonction glycol- $\alpha$  n'est pas oxydable à froid par l'acide periodique tandis que l' $\alpha$ -glycérophosphate renferme une fonction glycol- $\alpha$  oxydable par l'acide periodique (P. FLEURY et R. PARIS <sup>6</sup>). GODA mit en contact l'extrait de muscle dialysé et le  $\beta$ -glycérophosphate, il ne put ainsi déceler l'apparition d'une substance oxydable par l'acide periodique.

L'un de nous (7) a étudié l'action synthétisante en milieu glycérolé des phosphatases du rein de Porc et des graines d'Amande-douce. Dans les deux cas le glycérophosphate formé a été isolé; il est constitué presque exclusivement de l'isomère  $\alpha$ . D'autre part l'hydrolyse en milieu glycérolé soit de l' $\alpha$ - soit du  $\beta$ -glycérophosphate conduit au même équilibre final que la synthèse. Cependant tandis qu'à l'équilibre l' $\alpha$ -glycérophosphate n'est pas modifié, le  $\beta$ - est partiellement transformé en  $\alpha$ . Deux hypothèses permettent d'interpréter cette transposition:

a) hydrolyse plus accentuée du  $\beta$ -glycérophosphate que ne l'indique la libération de phosphore, une partie de l'acide phosphorique se combinant au glycérol et synthétisant de l' $\alpha$ -glycérophosphate de façon à maintenir constant l'équilibre



b) Intervention d'une mutase des glycérophosphates.

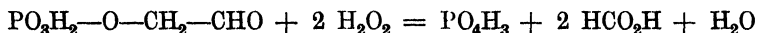
Si cette mutase existe elle n'accompagne pas toujours les phosphatases. Au cours de recherches sur les phosphatases végétales l'un de nous (8) a suivi l'hydrolyse des  $\alpha$ - et  $\beta$ -glycérophosphates en dosant d'une part l'acide phosphorique libéré et d'autre part le glycérol libéré (par oxydation periodique). L'isomérisation du  $\beta$ -glycérophosphate non oxydable par l'acide periodique en son isomère  $\alpha$ - oxydable augmente la consommation en acide periodique qui oxyde donc à la fois le glycérol libéré et l' $\alpha$ -glycérophosphate. Les dosages de glycérol et acide phosphorique libres donnent des résultats concordants; l'existence d'une mutase aurait conduit à

des résultats discordants: Les hydrolyses par la taka-diaïtase, les graines de Moutardes (blanche et noire), d'Amande-douce, de Pavot et de Haricot ne sont pas perturbées par une mutase. L'existence de cette mutase apparaît peu probable; nous avons cependant effectué des recherches complémentaires sur cette question.

**Mise au point d'une technique de recherche.** Une méthode, de principe assez simple, était la suivante: dosage par l'acide periodique de l'acide  $\alpha$ -glycérophosphorique formé à partir de son isomère  $\beta$ . Cette technique est parfaite en milieu défini et Melle M. C. BAILLY <sup>9)</sup> l'a utilisée pour démontrer que par chauffage en milieu acide l'acide  $\beta$ -glycérophosphorique se transposait en acide  $\alpha$ , la réaction est réversible mais l'équilibre nettement en faveur de la forme  $\alpha$ .

Les milieux biologiques renferment des substances oxydables par l'acide periodique (acide tartrique, glucides etc) qui sont parfois lentement oxydables comme l'un de nous l'a observé avec la taka-diaïtase <sup>(8)</sup>. De ce fait, la technique à l'acide periodique exigera donc la soustraction d'un terme correctif souvent important et d'une détermination délicate (l'oxydabilité de certains corps complexes variant avec le ph, la température, la durée de réaction).

Nous avons donc complété cette technique de façon à remplacer le dosage par différence par un dosage direct. Nous dosons le diosephosphate (hydroxyéthanal monorthophosphate)  $\text{PO}_3\text{H}_2\text{—O—CH}_2\text{—CHO}$  qui se forme par oxydation periodique de l' $\alpha$ -glycérophosphate (FLEURY et PARIS <sup>6)</sup>). Nous avons montré <sup>(10)</sup> qu'il est presque totalement déphosphorylé par le peroxyde d'hydrogène alcalin à la température ordinaire. Cette oxydation s'effectue selon le schéma:



Dans ces conditions les  $\alpha$ - et  $\beta$ -glycérophosphates ne sont pratiquement pas déphosphorylés. Nous avons tout d'abord recherché si l' $\alpha$ -glycérophosphate pouvait être dosé dans ces conditions \*) en présence de  $\beta$ -glycérophosphate.

1 à 5 cc d' $\alpha$ - ou  $\beta$ -glycérophosphate disodique M/10 sont mélangés à 10 cc d'acide periodique N/10 et 2 cc d'acide sulfurique N. Après un contact de 30 minutes à 20° l'oxydation periodique est terminée. La solution est neutralisée par de la soude en présence de phtaléine, additionnée de 10 cc d'eau oxygénée à 10 volumes et selon les cas de 20 cc de soude 2 N ou de 10 cc d'ammoniaque à 20%. Après 48 heures de contact à la température ordinaire la solution est neutralisée et l'acide phosphorique libéré est dosé par la technique de COPAUX après isolement préliminaire sous forme de sel ammoniaco-magnésien \*\*).

Les résultats obtenus (Tableau I) montrent qu'on peut doser avec une bonne approximation l'acide phosphorique de l' $\alpha$ -glycérophosphate. Avec une dose d' $\alpha$ -glycérophosphate supérieure à 20 mg de  $\text{P}_2\text{O}_5$  organique les résultats sont entachés d'une erreur par défaut de 5 % environ.

Le  $\beta$ -glycérophosphate n'est que très faiblement déphosphorylé: 3% environ. Il est ainsi possible de doser l' $\alpha$  en présence de  $\beta$ . Dans les milieux biologiques où nous recherchons la mutase il y aura vraisemblablement libération d'acide phosphorique et glycérol par hydrolyse phosphatasique. Nous avons cherché à doser l' $\alpha$ -glycérophosphate dans ce milieu plus complexe \*\*\*).

Nous avons suivi une technique dont voici les étapes: inactivation des diastases par chauffage, précipitation du phosphate minéral sous forme de sel de baryum en milieu neutre à la phtaléine, séparation de ce précipité, oxydation periodique en milieu acide de l' $\alpha$ -glycérophosphate, déphosphorylation du diosephosphate formé par le peroxyde d'hydrogène alcalin, dosage de l'acide phosphorique libéré.

\*) Le diosephosphate est rapidement hydrolysé par les acides minéraux à 100°, dans ces conditions le  $\beta$ -glycérophosphate est relativement stable. Les résultats obtenus en milieu acide sont moins précis qu'avec la technique au peroxyde d'hydrogène alcalin.

\*\*) L'excès d'acide periodique étant réduit par l'eau oxygénée la précipitation du periodate de magnésium ne risque pas de s'associer à celle du phosphate ammoniaco-magnésien.

\*\*\*) Les sels ferreux et cuivriques catalysent, en milieu acide et à la température ordinaire, la déphosphorylation des  $\alpha$ - et  $\beta$ -glycérophosphates par le peroxyde d'hydrogène. En milieu alcalin cette déphosphorylation n'a pas lieu. Il est donc inutile de se préoccuper des traces de fer et cuivre que peuvent renfermer les préparations fermentaires.

TABLEAU I.

mg de $P_2O_5$ organique mis en oeuvre	$\alpha$ -glycérophosphate	0	0	0	14	14	14	21	21	28	34
	$\beta$ -glycérophosphate	14	28	35	0	14	28	0	14	0	0
mg de $P_2O_5$ minéral libéré	milieu sodique	0,2	0,7	1,0	13,5	13,5	14,5	20,75	19,75	26,75	32,75
	milieu ammoniacal	0,2	0,7		14	13,5	14,25	20,5	20,5	26,75	33

**Technique utilisée.** 50 cc de  $\beta$ -glycérophosphate disodique M/10 sont amenés au pH voulu par l'acide acétique N, la solution, additionnée de la préparation diastasique, est amenée à 100 cc. Après un certain temps de contact, 10 cc sont prélevés et le phosphore minéral libéré est dosé par notre technique habituelle (8). Un second prélèvement de 10 cc est placé 10 minutes sur le bain-marie bouillant. Après refroidissement nous ajoutons 10 cc d'acétate de baryum M/10 et neutralisons à la phthaléine à l'aide de soude 2N. Il se forme un précipité barytique plus ou moins abondant selon le degré d'hydrolyse phosphatase et la teneur initiale en phosphates de la préparation fermentaire. Nous avons vérifié que la précipitation du phosphate barytique est très rapide et presque intégrale. Après 5 minutes de contact nous filtrons et lavons le précipité trois fois de suite avec 3 cc d'eau distillée. Les eaux de lavage sont jointes au filtrat, le baryum en excès est précipité par addition de 10 cc de sulfate de sodium M/10.

Sans séparer le sulfate de baryum, qui est sans influence sur l'oxydation periodique, nous acidifions par 2 cc d'acide sulfurique N et ajoutons 10 cc d'acide periodique N/10. Après 30 minutes de contact vers 20° on filtre la solution pour éliminer le sulfate de baryum qui pourrait catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène. Cette catalyse étant lente nous utilisons 20 cc de peroxyde d'hydrogène à 10 volumes pour laver le précipité. Cette eau oxygénée ayant servi au lavage est mélangée soit à 9 cc de lessive de soude à 30%, soit à 10 cc d'ammoniaque à 20%. Ces solutions mélangées sont versées dans le filtrat de l'oxydation periodique. Après 48 heures de contact à la température ordinaire l'acide phosphorique libéré est dosé par la technique indiquée plus haut.

Dans le tableau II nous avons groupé les résultats obtenus sur des milieux synthétiques analogues à ceux que nous pouvions rencontrer. Ces dosages ont donc été effectués sur des mélanges d' $\alpha$ - et  $\beta$ - glycérophosphates, orthophosphates et glycérol.

Quand on élimine par le baryum le phosphore minéral en présence de phosphore organique

TABLEAU II.

mg de $P_2O_5$ organique mis en oeuvre		mg de $P_2O_5$ minéral ajoutés	Cc de glycérol M/10 ajoutés	Cc d'acide periodique N/10 réduits par le précipité barytique *)	mg de $P_2O_5$ minéral dosés à la fin des diverses manipulations	
$\alpha$ -glycérophosphate	$\beta$ -glycérophosphate				Milieu sodique	Milieu ammoniacal
0	0	10	0	0	< 0,1	< 0,1
0	35	10	2	0,2	1,1	0,5
14	0	10	2	0,25	10,75	11,25
14	0	20	2	0,4	11,5	11,0
14	0	10	3	0,3	11,0	11,0
14	0	20	3	0,6	10,75	11,0
14	14	10	2	0,2	11,25	11,5
28	0	10	2	0,3	22,0	23,0
34	0	10	2	0,4	31,25	30,0

\*) 1 cc d' $\alpha$ -glycérophosphate M/10 correspond à 7,1 milligr. de  $P_2O_5$  organique et peut réduire 2 cc d'acide periodique N/10. 1 cc de glycérol M/10 peut réduire 4 cc d'acide periodique N/10.

ce dernier est fréquemment fixé en proportion plus ou moins importante par le précipité barytique. Nous avons dosé l' $\alpha$ -glycérophosphate dans ce précipité: ce dernier, lavé à l'alcool bouillant, est dissous dans l'acide chlorhydrique dilué, le baryum est précipité par l'acide sulfurique et l'acide glycérophosphorique titré par oxydation periodique selon la technique de FLEURY et PARIS <sup>6)</sup>. Les résultats obtenus font également partie du tableau II.

Nous sommes à même de constater qu'une petite quantité d' $\alpha$ -glycérophosphate est toujours retenue sur le précipité barytique. Cette quantité augmente avec la valeur du rapport phosphore minéral/phosphore organique. Cette perte et l'oxydation non intégrale du diosephosphate ne permettent de retrouver sous forme minérale que 85 à 90% du phosphore de l' $\alpha$ -glycérophosphate.

Si la technique n'est pas rigoureusement quantitative elle permet cependant de doser avec une bonne approximation l' $\alpha$ -glycérophosphate dans ces milieux complexes. L'addition d'une préparation fermentaire immédiatement avant la précipitation barytique n'a pas modifié sensiblement ces résultats. Avec une dose d' $\alpha$ -glycérophosphate correspondant à 35 mg de  $P_2O_5$  organique en présence de 2 et 4 cent. de diastase de l'Orge germée du Codex français nous avons retrouvé 27,0 et 29,4 mg de  $P_2O_5$  minéralisés. Toutefois, nous avons constaté dans certains cas que les substances étrangères introduites par la préparation fermentaire entravent la déphosphorylation oxydante du diosephosphate. Pour un dosage rigoureux il serait nécessaire de les éliminer par un défécant approprié. Comme nous voulions tout d'abord rechercher la mutase nous avons tourné la difficulté en vérifiant que de l' $\alpha$ -glycérophosphate ajouté au milieu était déphosphorylé: à une autre prise d'essai de 10 cc du mélange réactionnel où nous recherchons l' $\alpha$ -glycérophosphate nous ajoutons 4 cc d' $\alpha$ -glycérophosphate M/10 puis nous poursuivons parallèlement les deux séries de dosages. Nous avons obtenu, dans tous les cas, la minéralisation d'au moins 80% de l' $\alpha$ -glycérophosphate ajouté.

**Recherche de la mutase.** En utilisant la technique que nous venons de décrire nous n'avons jamais pu déceler la formation d' $\alpha$ -glycérophosphate à partir de son isomère  $\beta$ . Ne connaissant pas le ph optimum de la mutase éventuelle nous avons fait des essais en milieu acide et en milieu alcalin. Les préparations suivantes nous ont fourni des résultats négatifs \*).

Emulsine d'Amande-douce à ph 6,0 (+) et 37°.

Poudre d'Amande délipidée ph 6,0 (+) et 37°.

Amandes douces ph 9,4 (—) et 37°.

Amandes des noyaux de pêches ph 5,9 (+) à 17° et 37° et ph 9,4 (—) aux mêmes températures.

Graines d'Orge perlé ph 5,7 (+) à 18° et 37° et ph 9,0 (—) à 18° et 37°.

Graines de Pavot blanc ph 5,3 (+) à 18° et 37° et ph 9,4 (—) à 18° et 37°.

Limbes de feuilles fraîches d'Epinard à ph 5,0 (+), 8,2 (—) et 9,6 (—) tous ces essais à 18° et 37°.

Pulpe de placenta frais de Femme extraite par le chlorure de potassium isotonique; cette extraction est effectuée à 0° en utilisant 3 parties de placenta pour 4 de solution chlorurée ph 6,0 (+) et 7,8 (+) à 37°.

Autolysat de rein de Porc dans l'eau chloroformée ph 5,0 (+) 6,3 (+) 7,8 (+) 9,8 (—) à 20° et 37°.

Hématies humaines laquées dans l'eau distillée ph 8,0 (+) à 18° et 37°.

Divers échantillons d'urine humaine ph 8,0 (+) et 37°.

Sérum humain ph 8,5 (+) à 18° et 37°.

Tous ces essais ont fourni des résultats négatifs concordants. Voici à titre d'exemple les chiffres obtenus à ph 6,0 et 37° avec 0 g, 50 de poudre d'Amande délipidée pour 100 cc de  $\beta$ -glycérophosphate M/20. Les chiffres correspondent à des prises d'essai de 10 cc (contenant à l'origine 85 mg de  $P_2O_5$  organique).

Durée de réaction (en heures)	témoin	1	2	24	48
mg de $P_2O_5$ minéral libérés par la phosphatase .....	0	2,0	3,0	11,5	13,5
mg de $P_2O_5$ minéral après action de $IO_4H$ puis de $H_2O_2 + NH_3$ .....	0,5	0	1,0	0	0,5

\*) Les signes + ou — indiquent la présence ou l'absence d'une activité phosphatasique.

D'une façon générale on trouve en moyenne 0,5 mg de  $P_2O_5$  minéral après les diverses opérations (précipitation barytique, oxydation par l'acide periodique puis le peroxyde d'hydrogène alcalin). Les chiffres obtenus dans les recherches de mutase chevauchent avec ceux fournis par les témoins sans diastase; nous pouvons en déduire qu'il n'y avait pas de mutase dans les échantillons que nous avons étudiés. Il est impossible de généraliser des résultats négatifs et d'affirmer qu'une mutase des glycérophosphates n'existe pas; nous pouvons seulement constater que, si elle existe, elle est peu répandue.

Il est particulièrement intéressant de noter que les deux préparations fermentaires où l'on pouvait soupçonner la présence de la mutase n'en renferment pas; ce sont l'autolysat de rein de Porc et la poudre d'amande délipidée. La transposition biochimique du  $\beta$ -glycérophosphate en  $\alpha$ - observée par l'un de nous (7) en présence de ces deux préparations fermentaires provient donc d'une synthèse de l' $\alpha$ -glycérophosphate à partir des produits d'hydrolyse du  $\beta$ . Enfin, l'étude de ces diverses préparations contenant des phosphatases indique qu'une mutase ne paraît pas intervenir dans les hydrolyses phosphatasiques habituelles. On peut donc admettre que les multiples recherches effectuées sur les cinétiques d'hydrolyse des  $\alpha$ - et  $\beta$ -glycérophosphates, étudiées isolément ou simultanément ne sont pas perturbées par une mutase.

### Conclusions.

Divers faits expérimentaux pouvaient s'interpréter par l'existence d'une mutase isomérisant le  $\beta$ -glycérophosphate en  $\alpha$ .

Nous avons établi une technique analytique permettant la recherche de cette mutase. L' $\alpha$ -glycérophosphate est oxydé en diosephosphate qui est ensuite déphosphorylé par le peroxyde d'hydrogène alcalin. Dans ces conditions le  $\beta$ -glycérophosphate n'est pas oxydé et est déphosphorylé d'une façon négligeable.

La recherche de la mutase dans divers préparations fermentaires d'origine végétale ou animale a toujours fourni des résultats négatifs.

Nous remercions MM. les Professeurs H. HÉRISSEY et P. FLEURY pour l'intérêt qu'ils ont porté à nos recherches.

1) J. Courtois, Les esters phosphoriques des oses et holosides. *Revue. Ann. des ferment.* **6**, 1 (1941). — 2) O. Meyerhof, W. Kiessling, *Bioch. Zs.* **276**, 239 (1935). — 3) G. T. Cori, S. P. Colowick, C. F. Cori, *Jl. of Biol. Chem.* **123**, 375 (1938), **124**, 543 (1938). — 4) O. Meyerhof, Mac Eachern, *Bioch. Zs.* **260**, 417 (1933); O. Meyerhof, W. Kiessling, *ibid* **264**, 40 (1933), **283**, 83 (1935). — 5) T. Goda, *Bioch. Zs.* **297**, 347 (1938). — 6) P. Fleury, C. Paris, *Jl. de Pharm. Chim.* **18**, 470 (1933). — 7) J. Courtois, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **20**, 1393 (1938); *Jl. de Pharm. Chim.* **29**, 493 (1939). — 8) J. Courtois, *Th. Doct. Sc. Phys. Paris*, 1938; *Bull. Soc. Chim. Biol.* **17**, 1318 (1935); **20**, 1359, 1376 (1938). — 9) Melle M. C. Bailly *C.R.* **206**, 1902 (1938). — 10) J. Courtois, P. Biget, *C. R.* **213**, 192 (1941).

# Activité phosphatasique des os et mécanisme de production du rachitisme expérimental

PAR

J. ROCHE ET M. T. SIMONOT

(Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine et Pharmacie, Marseille)

(Avec 3 figures)

(10.X.41.)

## I. Objet du travail.

Les recherches de MELLANBY, de PAPPENHEIMER, ont permis de réaliser chez le Rat en croissance une dystrophie osseuse analogue au rachitisme humain, en faisant ingérer aux animaux un régime déséquilibré par excès de calcium (Ca/P supérieur à 2,5). De nombreux travaux ont établi par la suite que le rachitisme expérimental ainsi obtenu ne relevait pas seulement de facteurs alimentaires, mais aussi de facteurs osseux, nécessairement secondaires aux premiers. Nous nous sommes proposés d'apporter une contribution à l'étude de ceux-ci.

Deux problèmes ont retenu notre attention, à savoir: l'existence possible au cours du rachitisme, soit d'un trouble dans le mécanisme phosphatasique d'enrichissement des os en ions phosphoriques, soit d'un défaut d'aptitude des pièces squelettiques à fixer le „sel de l'os”.

Le premier pose la question suivante: Tout os en voie de développement rapide renferme en abondance un enzyme hydrolysant les esters phosphoriques (ROBISON), dont le principal rôle est de libérer des ions  $\text{PO}_4$  au niveau de la substance osseuse. La dystrophie rachitique est-elle en relation avec une diminution de l'activité phosphatasique des os? Il ne le semble pas, d'après les observations qualitatives faites par ROBISON et SOAMES <sup>1)</sup>, par DEMUTH <sup>2)</sup>, par POLICARD, PÉHU, ROCHE et BOUCAUMONT <sup>3)</sup>, suivant lesquels les os des sujets en période aiguë de rachitisme expérimental ou pathologique sont plus riches en enzyme que ceux des témoins normaux. De plus, l'existence d'une hyperphosphatasémie précoce dans le rachitisme humain est un fait classique, l'origine osseuse de l'excès d'enzyme alors présent dans le sérum étant a priori très probable (RAOUL et VINET <sup>4)</sup>).

Par contre, selon SCOZ <sup>5)</sup> „dans le rachitisme expérimental, le ralentissement des processus de synthèse osseuse est caractérisé par une diminution du pouvoir phosphatasique de l'os... tandis que la guérison va de pair avec une augmentation de celui-ci.” Les expériences de SCOZ <sup>5, 6)</sup> ayant donné des résultats en désaccord avec ceux des auteurs précédents méritaient d'être reprises et étendues, d'autant plus que toutes les autres observations, poursuivies sur un petit nombre de sujets en période de rachitisme aigu, n'apportent pas de données sur les variations de l'activité phosphatasique des os au cours du rachitisme expérimental. Or celui-ci présente une évolution régulière bien connue des biochimistes.

Lorsque des Rats de 30 grammes reçoivent un régime rachitigène (Ca/P = 3 environ) leurs os longs sont le siège, en particulier au niveau de leur cartilage de conjugaison, de troubles progressifs de la calcification atteignant leur maximum d'intensité en quinze jours. Ces troubles regressent par la suite et, lorsque les animaux ont atteint le poids de 70 à 80 grammes, ce qui exige en général trente jours, leurs os sont redevenus à peu près normaux à l'examen radiographique, bien que leur minéralisation demeure inférieure à celle des animaux témoins de même poids (A. ROCHE et I. GARCIA <sup>7)</sup>). Il en est probablement ainsi parce que l'organisation des lésions du type rachitique n'est possible qu'avec une croissance très rapide des os n'existant qu'au début de la vie. Quoiqu'il en soit, les jeunes animaux soumis à un régime rachitigène par déséquilibre salin, présentent d'abord des lésions osseuses qui disparaissent par la suite, bien que les conditions de l'expérience demeurent les mêmes.

Nous nous sommes proposés d'étudier les variations de l'activité phosphatasique des os d'animaux en croissance au cours de cette évolution du rachitisme expérimental.

Le second des problèmes que nous nous sommes posés porte sur une phase de l'ossification encore mal connue, à savoir la fixation des sels à la partie protéique des pièces squelettiques.

La genèse de la substance osseuse comporte la transformation d'un tissu indifférencié en une matrice douée d'une aptitude exceptionnelle à retenir les sels phosphocalciques. Il est donc possible que le rachitisme soit dû à une réduction de l'affinité de la substance osseuse pour les ions phosphorique et calcium, comme l'ont déjà pensé LEHNERDT <sup>8)</sup>, PFAUNDLER <sup>9)</sup>, FREUDENBERG et GYORGY <sup>10)</sup>, SHIPLEY, HOWLAND et KRAMER <sup>11)</sup>, KLINKE <sup>12)</sup>, ROSENHEIM <sup>13)</sup>, la plupart de ces auteurs ayant localisé leur attention sur le calcium osseux. Il nous a paru que l'on ne pouvait se faire à cet égard une opinion ferme que par des expériences d'ordre quantitatif que nous avons essayé de réaliser.

Tels sont les deux buts de ce travail.

## II. Recherches personnelles.

### A. Variations de l'activité phosphatasique des os pendant l'évolution du rachitisme expérimental.

Nous avons soumis vingt sept rats \*) pesant de 25 à 30 grammes au régime rachitigène de RANDOIN et LECOQ et sacrifié les ani-

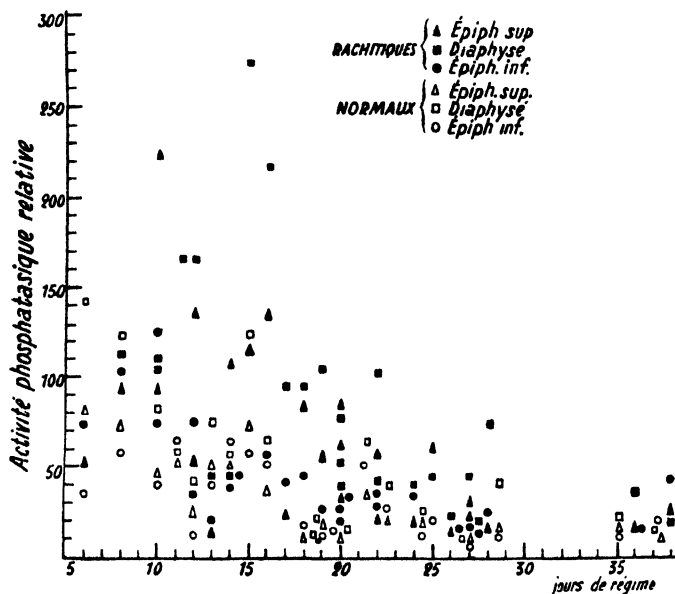


Fig. 1. Activité phosphatasique relative des fémurs de Rats de même poids, normaux (○ △ □) ou soumis depuis des temps divers au régime rachitigène (● ▲ ■).  
Abscisses: jours de régime rachitigène.  
Ordonnées: activité phosphatasique.

maux à des temps divers compris entre le sixième et le quarantième jour d'expérience, les lésions osseuses atteignant leur maximum en quinze jours d'expérience et disparaissant à l'examen radiographique en trente environ. Les os ont été soigneusement disséqués et l'activité phosphatasique en a été dosée par la méthode mise au point par l'un de nous, FILIPPI et LÉANDRI <sup>14)</sup>, rapportant le pouvoir phosphoestérasique à la matrice protéique des os afin d'éliminer les possibilités d'erreur dues à des inégalités de minéralisation. Les dosages ont porté sur les tibias et les fémurs (diaphyse et épiphyse séparées), sur les omoplates, sur les os de la voûte du crâne et sur les incisives.

On trouvera dans les figures 1, 2 et 3 l'ensemble des données obtenues, auxquelles nous avons joint celles déterminées antérieurement par ROCHE, FILIPPI et LÉANDRI <sup>14)</sup> sur des animaux normaux de même poids provenant du même élevage.

Les résultats obtenus, dont la signification sera discutée plus bas, traduisent dans leur

\*) On trouvera le détail des données relatives à ces expériences dans un travail d'ensemble de l'un de nous <sup>15)</sup>.

ensemble une augmentation de l'activité phosphatasique des os chez les animaux rachitiques dans la période où les lésions osseuses s'organisent, les premières manifestations histologiques de la dystrophie apparaissant en deux jours au niveau des cartilages de conjugaison et atteignant leur maximum d'intensité en douze à quinze jours. Par contre, on note une diminution du pouvoir phosphoestérasiqne lorsque ces mêmes lésions régressent, leur disparition à l'examen radiographique s'opérant en trente jours environ.

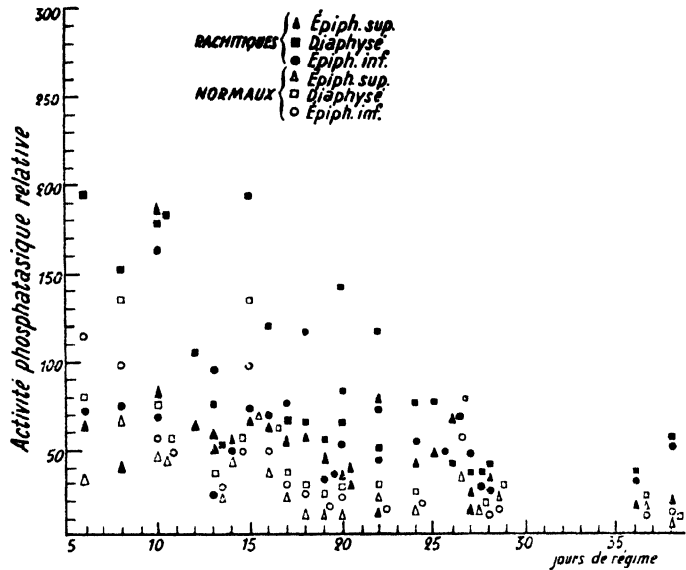


Fig. 2. Activité phosphatasique relative des tibias de Rats de même poids normaux (○ □ △) ou soumis depuis des temps divers à un régime rachitigène (● ▲ ■).

Abscisses: jours de régime rachitigène.  
Ordonnées: Activité phosphatasique.

### B. Variations de l'affinité des os pour les ions phosphoriques et calcium dans le rachitisme expérimental.

La mesure *in vitro* de l'affinité d'un fragment osseux en voie de calcification pour les ions phosphoriques et calcium a exigé une laborieuse mise au point technique, dont on trouvera l'exposé dans un travail antérieur de l'un de nous (15). En voici le principe: 50 à 60 mg de la zone d'ossification du tibia comprenant la région juxta épiphysaire du cartilage de conjugaison et le début de la métaphyse sont rassemblés à partir du squelette de six Rats. On les place pendant 16 heures à 37° dans 15 cc. d'une solution contenant par 100 cc., 10 mg Ca et 5 mg P (à l'état de phosphates), de pH = 7,1 \*).

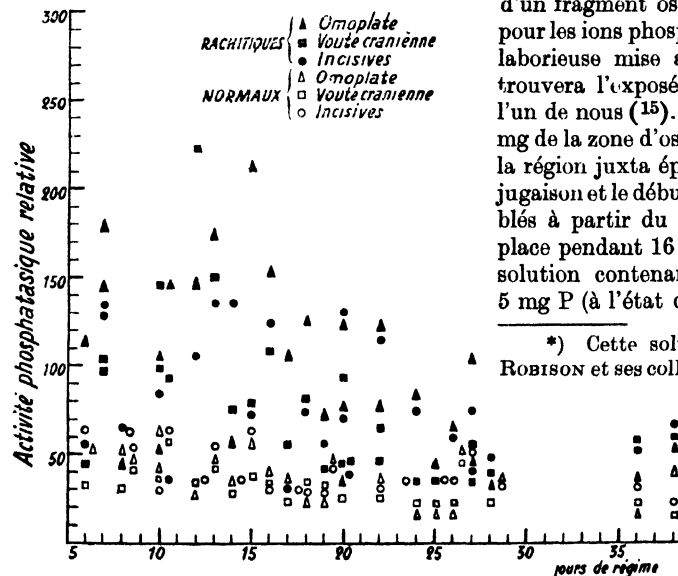


Fig. 3. Activité phosphatasique relative d'omoplates, de voutes crâniennes et d'incisives de Rats normaux (○ △ □) ou soumis depuis des temps divers à un régime rachitigène (● ▲ ■).

Abscisses: jours de régime rachitigène.  
Ordonnées: Activité phosphatasique.

\*) Cette solution, couramment utilisée par ROBISON et ses collaborateurs pour leurs recherches

de l'ossification *in vitro*, contient par 100 cc.: 0,027 gr. Ca Cl<sub>2</sub>; 2,42 cc. de solution tampon de phosphates m/15 de SÖRENSEN à pH = 7,1; 0,90 g Na Cl; 0,03 g NaHCO<sub>3</sub>; 0,04 gr KCl; 0,025 MgSO<sub>4</sub>. La petite quantité de CaCO<sub>3</sub> se formant au moment de la préparation est dissoute par HCl à 1 pour 100 et l'on ramène ensuite le pH à 7,1.



Une quantité voisine du même matériel osseux est placée, dans des conditions identiques, dans 15 cc. d'une solution de même composition que la précédente, à ceci près qu'elle ne renferme ni calcium, ni phosphates; on constitue ainsi un essai témoin. En effet, le dosage du calcium (méthode de KRAMER et TISDALL) et des phosphates (méthode de BRIGGS — ROBISON) au début et à la fin de l'expérience dans l'une et l'autre macération osseuse permet de préciser, d'une part les quantités d'ions  $\text{PO}_4$  et  $\text{Ca}^{++}$  perdues par les fragments étudiés dans les solutions qui ne renferment pas ces ions et, d'autre part, les quantités de ceux-ci fixées dans le milieu les contenant.

De nombreuses expériences préliminaires poursuivies sur le cartilage de conjugaison ou sur la métaphyse d'os longs de jeunes veaux, nous ont permis de constater que l'on peut mesurer avec une approximation satisfaisante l'affinité de ces tissus pour les ions  $\text{PO}_4$  et  $\text{Ca}^{++}$  par la somme: Quantité d'ions  $\text{PO}_4$  et  $\text{Ca}^{++}$  disparues de la solution renfermant ceux-ci + Quantité des mêmes ions abandonnées par les témoins.

Ce mode de calcul ne saurait être tenu pour rigoureux, mais, dans le cas présent, la netteté des résultats obtenus justifie son emploi. Dans les conditions où nous nous sommes placés, les fragments osseux témoins ne perdent pratiquement pas de phosphates, tandis qu'ils cèdent au milieu des quantités appréciables de calcium; aussi nos résultats sont-ils à coup sûr plus précis en ce qui concerne les premiers que le second \*).

Nos expériences ont porté sur quatre lots de six rats pesant environ 80 g, dont deux, servant de témoins, ont reçu une alimentation normale, tandis que les deux autres ont été soumis au régime rachitigène de RANDOIN-LECOQ pendant dix jours, ce délai étant nécessaire pour obtenir des lésions importantes. Les animaux ont été sacrifiés le même jour et l'affinité de la zone d'ossification de leurs tibias pour les ions  $\text{PO}_4$  et  $\text{Ca}^{++}$  a été mesurée suivant le procédé décrit plus haut. Les résultats obtenus ont été les suivants:

Etat des animaux	Poids d'os (mg)	$\gamma$ Ca fixés	$\gamma$ P fixés
Normal (6 rats) .....	52	227	195
Normal (6 rats) .....	47	195	120
Rachitique (6 rats) .....	67	15 environ	45
Rachitique (6 rats) .....	62	44	15 environ

Ces données témoignent d'une très importante diminution de l'aptitude de la zone d'ossification tibiale à fixer les ions phosphorique et calcium au cours du rachitisme expérimental.

### III. Conclusion.

Les faits observés sont significatifs tant en ce qui concerne les facteurs osseux du rachitisme expérimental que le rôle de la phosphatase dans l'ossification.

Il est hors de doute que la dystrophie osseuse étudiée n'est pas due à une réduction de l'activité phosphatasique des pièces squelettiques comme le pense Scoz<sup>5, 6</sup>). Bien plus, les os des rachitiques sont plus riches en phosphatase que chez les animaux normaux de même poids dans la période où les lésions s'organisent, tandis qu'il n'en est plus de même lorsque celles-ci régressent.

La mise en évidence d'une augmentation précoce de l'activité phosphatasique des os au cours du rachitisme expérimental mérite d'être rapprochée des observations faites sur l'hyperphosphatasémie des rachitiques humains. Comme l'ont récemment rappelé RAOUL et VINET

\*) L'indépendance relative du comportement des ions  $\text{PO}_4^{---}$  et  $\text{Ca}^{++}$  dans ces essais est en accord avec de récentes observations de LOGAN et KANE<sup>16</sup>) sur la solubilité des sels de l'os dans les humeurs.

„ce symptôme apparaît avant les signes cliniques et radiographiques et même avant les autres signes biochimiques . . . ; il se retrouve constamment dans le prérachitisme des enfants normaux au point de vue clinique (*loc. cit.* p. 208, (4)).” Nos recherches apportent donc une justification de la détermination précoce de la phosphatasémie chez les rachitiques et permet de préciser que celle-ci ne saurait avoir d'intérêt quand la guérison des lésions est amorcée.

Il n'est pas actuellement possible de préciser avec certitude le mécanisme de ces faits. Comme on l'a souvent observé (ROBISON et FELL<sup>16</sup>), ROCHE et BULLINGER<sup>17</sup>), la substance préosseuse (os et dents embryonnaires) est toujours la plus riche en phosphatase dans la période qui précède la calcification massive. Tout se passe comme si, dans le cas présent, son évolution normale était en quelque sorte arrêtée à un stade où l'enzyme est produit en abondance sans que la calcification soit déjà possible. La phosphatase apparaît ici, une fois de plus, comme n'intervenant que pour permettre un enrichissement local en ions phosphorique sans relation avec la fixation des sels sur les os. Celle-ci est uniquement régie par les propriétés de la matrice protéique en voie de formation. Le défaut de calcification du squelette provoqué expérimentalement par l'administration des régimes rachitigènes usuels relève directement d'une réduction de l'affinité des os pour les ions phosphorique et calcium. Notre conclusion rejoint à cet égard celle de ROSENHEIM<sup>13</sup>), à savoir: „que l'aptitude du cartilage à se calcifier diminue au fur et à mesure que l'on prolonge la période de régime rachitigène”.

Les observations que nous avons faites dans ce domaine ne font que traduire une modification profonde de la matrice protéique de l'os en voie de formation. A ce titre, elles attirent à nouveau l'attention sur les protéines de celle-ci, dont une connaissance plus approfondie est indispensable au progrès de nos connaissances dans la biochimie de l'ossification.

### Résumé.

1. Le rat en croissance soumis à un régime rachitigène par excès de calcium présente une forte augmentation de l'activité phosphatasique de ses os, longs ou plats, pendant la période où les lésions osseuses se développent. Le pouvoir phosphoestérasique des pièces squelettiques redevient par la suite progressivement normal, tandis que le rachitisme régresse („guérison spontanée”). Le défaut de calcification des os ne tient donc pas à un abaissement de l'activité phosphatasique dans le cas étudié.

2. La précocité de l'hyperphosphatasémie observée au cours du rachitisme doit être reliée à l'hyperproduction intense et rapide d'enzyme par l'os.

3. Le rachitisme expérimental va de pair avec une forte diminution de l'aptitude des os à fixer les ions phosphorique et calcium *in vitro*.

1) R. Robison, K. M. Soames, *Biochem. Jl.* **19**, 153 (1925). — 2) F. Demuth, *Bioch. Zs.* **166**, 162 (1925). — 3) A. Policard, M. Pehu, J. Roche, J. Boucaumont, *Bull. Histol. Appl.* **8**, 171 (1931). — 4) Y. Raoul, A. Vinet, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **23**, 205 (1941). — 5) G. Scoz, *Boll. Soc. Ital. Biol. sperim.* **10**, 823 (1935). — 6) G. Scoz, E. G. Zorzi, *Enzymol.* **8**, 177 (1940). — 7) A. Roche, I. Garcia, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **18**, 1014 (1936). — 8) F. Lehnerdt, *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* **6**, 120 (1910). — 9) L. Pfaundler, *Jhb. Kinderheilk.* **60**, 123 (1904). — 10) E. Freudenberg, P. Gyorgy, *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* **24**, 17 (1923). — 11) P. G. Shipley, J. Howland, B. Kramer, *Biochem. Jl.* **20**, 379 (1926). — 12) K. Klinke, *Mineralstoffwechsel*, Leipzig, 1931. — 13) A. Rosenheim, *Biochem. Jl.* **28**, 708 (1934). — 14) J. Roche, A. Filippi, A. Leandri, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **19**, 1314 (1937). — 15) M. T. Simonot, *Recherches sur le mécanisme du rachitisme expérimental*, Thèse Doct. Pharm., Marseille 1940. — 16) R. Robison, H. B. Fell, *Biochem. Jl.* **28**, 2243 (1934). — 17) J. Roche, E. Bullinger, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **21**, 166 (1939).

# Influence des dinitrophénols sur la pyruvo- et la succinodéshydrogénase

PAR

L. MASSART ET L. VANDENDRIESSCHE

(Lab. de Chim. physiol., Ec. Vétér., Univ., Gand.)

(24.X.41.)

Il a été démontré dans une publication de ce laboratoire (1) concernant l'action biochimique des dinitrophénols sur les cellules de levure, que ces composés sont des inhibiteurs puissants de la carboxylase. Considérés par rapport au pouvoir inhibiteur, on peut classer les dinitrodérivés étudiés de la façon suivante: dinitrophénol 2,5  $\geq$  dinitrophénol 2,4 > dinitrocyclopentyl-oxybenzol > dinitro- $\alpha$ -naphтол > dinitrothymol > dinitrocrésol > dinitrophénol 2,6. Le paramononitrophénol et le phénol même sont peu ou pas toxiques.

D'autre part, nous avons communiqué récemment (2) que certains dinitrophénols, à savoir les dinitrophénols 2,4 et 2,5 inhibent fortement la pyruvodéshydrogénase, alors que le dinitrophénol 2,6 est inactif à la même concentration. Dans la même communication préliminaire, nous avons dit que ces résultats revêtent, à notre avis, une triple importance:

1°. ils pourraient expliquer la toxicité marquée des dinitrophénols vis à vis des sujets animaux;

2°. ils permettent d'aborder d'un autre côté le problème que LONG et PETERS (3) se sont posé, à savoir l'analogie dans le comportement de la carboxylase et de la pyruvodéshydrogénase;

3°. ils pourraient donner des indications sur la place qu'occupe la pyruvodéshydrogénase dans la respiration principale, à condition que l'inhibition constatée est suffisamment spécifique, ce qui d'après certains résultats obtenus semblait être le cas. Ce sont surtout les deux derniers points que nous étudierons plus en détail dans ce travail.

LONG et PETERS (3) en étudiant le mécanisme d'action de la carboxylase et de la pyruvodéshydrogénase, ont pu démontrer que la décarboxylation oxydative est spécifique, en ce sens que le  $\alpha$ -ketoalérate n'est pas attaqué par la pyruvodéshydrogénase, tandis qu'il est décarboxylé activement par la carboxylase de la levure. Ils en ont conclu que la partie protéique de la carboxylase et de la pyruvodéshydrogénase sont différentes. Nos résultats montrent toutefois que si les parties protéiques des deux ferments considérés, ne sont pas identiques, ils se comportent toutefois d'une façon analogue vis à vis d'inhibiteurs tels que le dinitrophénol et le bleu de méthylène, ce qui pourrait s'expliquer par l'existence de groupements identiques dans la partie protéique des deux ferments en question.

En ce qui concerne les dinitrophénols, nous avons pu démontrer, que tous les composés qui inhibent la carboxylase, diminuent aussi l'activité de la pyruvodéshydrogénase. En outre, en classant les corps étudiés par rapport au pouvoir inhibiteur, on obtient la même série que pour la carboxylase, à savoir: dinitrophénol 2,5  $\geq$  dinitrophénol 2,4 > dinitrocyclopentyl-oxybenzol > dinitrothymol > dinitrocrésol > dinitrophénol 2,6. Le paramononitrophénol et le phénol sont, tout comme pour la carboxylase, peu ou pas toxiques (cf. Tableau I).

Pour mettre l'action des dinitrodérivés en évidence, nous avons préparé la pyruvodéshydrogénase à partir du tissu cérébral du cobaye en suivant les prescriptions de LONG et PETERS (3). En général, nous avons obtenu par cette méthode des extraits actifs; il nous est arrivé toutefois aussi d'obtenir des préparations, qui ne réagissaient pas sur l'addition de pyruvate, c. à d. pour lesquelles le temps de décoloration du bleu de méthylène était le même avec et sans addition de pyruvate. Notons que LONG et PETERS ont élaboré leur méthode pour du tissu cérébral de pigeon. Les difficultés que nous avons rencontrées proviennent probablement de la différence dans les animaux d'expérience.

PETERS et WAKELIN citent dans un appendice de la publication de LONG et PETERS (3), que

TABLEAU I.

Influence des dinitrophénols sur la puruvodéhydrase.

Méthode de THUNBERG modifiée suivant SZENT-GYÖRGYI (5).

Les tubes contiennent: 0,3 cc de phosphate RINGER (3) ou resp. 0,3 cc du corps étudié dans du phosphate RINGER; 0,2 cc de bleu de méthylène (40 γ); 0,3 cc de phosphate RINGER ou resp. 0,3 cc de pyruvate 5% dans du phosphate RINGER; 1 cc de la préparation de pyruvodéhydrase.

corps étudié	temps de réduction en minutes.							
	sans pyruvate.	avec pyruvate — concentration du corps étudié						
		0	$10^{-3}$ M	$5 \cdot 10^{-4}$ M	$10^{-4}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M
dinitrophénol 1.2.5 .....	> 30	15	—	—	> 30	—	—	—
	> 20	9	> 20	—	—	—	—	—
	> 30	15	—	—	> 30	—	24	15
	> 30	15	—	—	> 30	—	24	15
	> 30	16	—	—	—	—	25	—
	> 30	16	—	—	—	—	25	—
	> 30	16	—	—	—	—	26	—
dinitrophénol 1.2.6 .....	> 30	11	—	—	—	—	12	—
	> 30	11	—	—	18	—	—	—
dinitrophénol 1.2.4 .....	> 30	11	—	—	—	—	25	—
	> 30	11	—	—	> 30	—	—	—
dinitrocyclopentyloxybenzol ..	> 12	$6\frac{1}{2}$	—	—	—	—	$6\frac{1}{2}$	—
	> 12	$6\frac{1}{2}$	—	—	11	—	7	—
	> 16	8	—	16	—	—	—	—
dinitrothymol .....	> 15	7	—	—	10	12	—	—
	> 15	7	—	—	10	13	—	—
dinitrocrésol .....	> 15	$6\frac{1}{2}$	> 15	—	$7\frac{1}{2}$	—	$6\frac{1}{2}$	—
paramononitrophénol .....	15	6	$7\frac{1}{2}$	—	—	7	—	—
	15	6	$7\frac{1}{2}$	—	—	7	—	—
phénol .....	15	9	8	—	—	—	—	—
	15	8	8	—	8	—	—	—

dans certaines expériences aérobies ils ont constaté une inhibition de la pyruvodéhydrase par le bleu de méthylène, alors qu'aux mêmes concentrations en milieu anaérobie, ils n'ont pu observer aucune action défavorable du bleu de méthylène. Or MICHAELIS (4) a pu démontrer que le bleu de méthylène est un inhibiteur de la carboxylase. L'un de nous a confirmé et étendu ce dernier résultat en démontrant que cette inhibition est surtout marquée en milieu aérobie (1). Nous avons repris ces expériences et nous avons pu prouver que l'action du bleu de méthylène sur la carboxylase est progressive. Cette inhibition progressive se retrouve d'ailleurs pour la thionine, le bleu de crésyl et le bleu de toluidine.

Pour étendre les analogies dans le comportement de la carboxylase et de la pyruvodéhydrase, nous avons étudié l'influence du bleu de méthylène sur l'oxydation du pyruvate par le tissu cérébral du lapin. Nous avons pu constater ainsi, que ce tissu montre, après une courte activation transitoire, une inhibition considérable et progressive de la consommation d'oxygène en présence de bleu de méthylène  $\frac{M}{1.000}$  (tableau II).

Pour situer la pyruvodéhydrase dans le cycle de la respiration principale, nous avons étudié l'action des dinitrophénols sur le muscle de pigeon préparé d'après SZENT-GYÖRGYI et coll. (5). Nous avons pu constater ainsi, que la décoloration du bleu de méthylène par ce tissu est forte-

TABLEAU II.

Influence du bleu de méthylène sur l'oxydation du pyruvate.

Les appareils de WARBURG contiennent: 1 cc. d'une suspension de tissu cérébral de cobaye (1 gr. de tissu coupé en morceaux très minces et puis suspendu dans 10 cc. de RINGER-phosphate); 0,7 cc. de RINGER-phosphate sans ou avec bleu de méthylène (concentration finale  $10^{-3}$  M); 0,3 cc de pyruvate de sodium (concentration finale  $\frac{M}{50}$ ); KOH pour l'absorption de  $CO_2$ . Les résultats sont donnés en  $mm^3$  de  $O_2$  de 30 en 30 minutes pendant deux heures.

	sans bleu de méthylène	avec bleu de méthylène
de 0 à 30 min. ....	95	58
30 à 60 min. ....	90	32
60 à 90 min. ....	85	18
90 à 120 min. ....	83	13

TABLEAU III.

Influence des dinitrophénols sur la décoloration du bleu de méthylène par le muscle pectoral du pigeon.

Le muscle pectoral du pigeon est passé à travers un broyeur de LATAPIE, suspendu dans un tampon au phosphate de pH 7,3, puis passé à travers un linge. On obtient ainsi une suspension très fine, qui contient tous les ferments de la respiration principale (5).

Les tubes de THUNBERG contiennent: 1 cc de la suspension tissulaire; 0,5 cc de bleu de méthylène  $\frac{1}{5.000}$ ; 0,7 cc de tampon ou resp. 0,7 cc du dinitrophénol étudié.

corps étudié	temps de réduction en minutes — concentration du corps étudié					
	0	$10^{-3}$ M	$5 \cdot 10^{-4}$ M	$10^{-4}$ M	$5 \cdot 10^{-5}$ M	$10^{-5}$ M
dinitrophénol 1.2.5 .....	$2\frac{3}{4}$ 2 $2\frac{1}{4}$	— — —	— — —	$8\frac{1}{2}$ — —	— 5 —	$2\frac{3}{4}$ — 3
dinitrophénol 1.2.4 .....	$2\frac{3}{4}$ 2 $2\frac{3}{4}$ 2 $2\frac{1}{4}$	— > 10 — — —	— — — — —	$7\frac{3}{4}$ — $7\frac{3}{4}$ — $8\frac{1}{4}$	— — — $4\frac{3}{4}$ —	— — — — —
dinitrophénol 1.2.6 .....	2 2 2	$2\frac{1}{2}$ 4 —	— $2\frac{3}{4}$ $2\frac{3}{4}$	— — —	— — —	— — —

ment retardée. Il est remarquable, que tout comme pour la carboxylase et la pyruvodéhydrase, les dinitrophénols 1.2.5 et 1.2.4. exercent une action inhibitrice très forte, tandis que le dinitrophénol 1.2.6. ne provoque pas d'inactivation (tabl. III). Ces résultats pourraient faire penser que la pyruvodéhydrase occupe une place importante dans le cycle de la respiration principale, de telle façon qu'une inhibition de la pyruvodéhydrase entraînerait automatiquement un arrêt de la respiration. Nous nous trouvons en effet devant un phénomène analogue à celui de l'inhibition de la respiration par l'acide malonique, sur lequel SZENT-GYÖRGYI (6) a construit la théorie de la catalyse par les acides dicarboxyliques en  $C_4$ . Les conceptions actuelles n'attribuent pas un rôle aussi important à la pyruvodéhydrase. Nous avons en conséquence examiné de plus près la spécificité de l'inhibition causée par les dinitrophénols. Nous avons étudié entre autres l'action

des dinitrophénols sur la succinodéhydrogénase, ferment pour lequel le muscle pectoral du pigeon constitue une source très riche. Nous avons pu constater ainsi, que les dinitrophénols 1.2.4. et 1.2.5. retardent considérablement la décoloration du bleu de méthylène par la succinodéhydrogénase. Le dinitrophénol 1.2.6 est de nouveau presque dépourvu d'action à la même concentration ( $10^{-4}$  M). Les autres dinitrophénols et surtout le dinitrothymol sont des inhibiteurs marqués; le phénol et le paramononitrophénol sont peu ou pas toxiques (tabl. IV).

TABLEAU IV.

Influence des dinitrophénols sur la succinodéhydrogénase.

La succinodéhydrogénase est préparée à partir du muscle pectoral du pigeon d'après la méthode de LEHMAN<sup>10</sup>). Les tubes de THUNBERG contiennent: 1 cc de la préparation fermentaire; 0,5 cc de bleu de méthylène  $\frac{1}{5.000}$ ; 0,3 cc de tampon au phosphate pH 7,3 ou resp. 0,3 cc de succinate de sodium ( $C_4O_4H_4Na_2 \cdot 10$  aq.) 10%: 0,7 cc d'eau ou resp. 0,7 cc du dinitrophénol étudié.

corps étudié	temps de réduction en minutes			
	sans succinate	avec succinate	concentration du corps étudié (en présence de succinate)	
			$10^{-4}$ M	$10^{-6}$ M
dinitrophénol 1.2.5 .....	> 20 > 20 > 20	$2\frac{1}{2}$ 3 3	11 — —	— $4\frac{1}{2}$ $4\frac{1}{2}$
dinitrophénol 1.2.4. ....	> 20 > 20	$2\frac{1}{2}$ 3	$15\frac{1}{2}$ —	— $5\frac{1}{4}$
dinitrophénol 1.2.6 .....	> 20 > 20	$2\frac{1}{2}$ 3	$3\frac{3}{4}$ $4\frac{1}{4}$	— —
dinitrothymol .....	> 20 > 20	$3\frac{1}{2}$ $3\frac{1}{2}$	14 14	— —
dinitrocyclopenthyloxybenzol .....	> 20 > 20	$3\frac{1}{2}$ $3\frac{1}{2}$	8 8	— —
dinitrocrésol .....	> 20 > 20	$3\frac{1}{2}$ $3\frac{1}{2}$	$4\frac{1}{2}$ $4\frac{1}{2}$	— —
paramononitrophénol .....	> 20 > 20	$3\frac{1}{2}$ $3\frac{1}{2}$	$3\frac{3}{4}$ $3\frac{3}{4}$	— —
phénol .....	> 20 > 20	$3\frac{1}{2}$ $3\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$ $3\frac{1}{2}$	— —

D'après SZENT-GYÖRGYI et coll. (6, 7) le schéma de la respiration principale peut être représenté de la façon suivante:

$O_2$ —système WARBURG, KEILIN—succinodéhydrogénase—diaphorase  $\leftarrow H_2$ .

EULER<sup>8</sup>) et GREEN<sup>9</sup>) admettent toutefois que la diaphorase peut réagir avec le cytochrome sans passer par la succinodéhydrogénase. L'inhibition de la succinodéhydrogénase par les dinitrophénols permet de réenvisager cette question. D'après la théorie de SZENT-GYÖRGYI l'oxydation de substrats tels que le lactate, le succinate, le pyruvate doit être inhibée de la même façon que la respiration sans addition de substrat. En étudiant la décoloration du bleu de méthylène par le muscle de pigeon (5) avec et sans addition de succinate, pyruvate et lactate, nous avons pu observer:

1°. que la décoloration du bleu de méthylène est retardée par les dinitrophénols avec et sans addition des substrats mentionnés;

2°. que l'addition de pyruvate seul, provoque une inhibition considérable, qui est encore renforcée en présence de dinitrophénol (tabl. V).

TABLEAU V.

Influence des dinitrophénols sur la décoloration du bleu de méthylène par le muscle pectoral du pigeon, sans et avec addition de différents substrats. Le muscle pectoral du pigeon est traité comme il a été décrit pour le tableau III. Les tubes de THUNBERG contiennent: 1 cc de la préparation tissulaire; 0,5 cc de bleu de méthylène  $\frac{1}{5.000}$ ; 0,3 cc de tampon au phosphate pH 7,3 ou resp. 0,3 cc du substrat à la concentration de 5%. Le dinitrophénol employé est le 1.2.5.

temps de décoloration en minutes — concentration en dinitrophénol							
0	$10^{-4}$ M	$5.10^{-5}$ M	$10^{-5}$ M	0	$10^{-4}$ M	$5.10^{-5}$ M	$10^{-5}$ M
sans addition de substrat				avec addition de succinate			
4	32	—	—	$3\frac{1}{4}$	$13\frac{1}{2}$	—	—
$4\frac{1}{4}$	—	$13\frac{1}{2}$	—	$3\frac{1}{4}$	—	10	—
				avec addition de lactate			
$4\frac{1}{2}$	—	—	$13\frac{1}{2}$	$3\frac{1}{2}$	—	—	11
$4\frac{1}{2}$	32	—	—	$3\frac{1}{2}$	20	—	—
				avec addition de pyruvate			
$4\frac{1}{2}$	—	$12\frac{1}{2}$	—	19	—	> 40	—

Ces résultats, plus spécialement ceux cités sous le 1°, appuient donc d'une façon excellente la théorie de SZENT-GYÖRGYI. Si l'on se sert toutefois de l'oxygène à la place du bleu de méthylène comme accepteur de l'hydrogène activé, on constate que l'inhibition causée par les dinitrophénols est 50 à 100 fois moins forte et les trois dinitrophénols à savoir le 1.2.4, le 1.2.5 et le 1.2.6 présentent un degré de toxicité quasiment égal (tabl. VI). Ce résultat peut être interprété de deux façons:

TABLEAU VI.

Le muscle pectoral de pigeon est traité tel qu'il a été décrit pour le tableau V. Les appareils de WARBURG contiennent: 1 cc de la préparation tissulaire, 0,7 cc de tampon au phosphate ou resp. 0,7 cc du dinitrophénol étudié, KOH pour l'absorption de  $\text{CO}_2$ . Les résultats sont exprimés en  $\text{mm}^3$  d' $\text{O}_2$  absorbé en 30 min.

sans dinitrophénol	avec dinitrophénol 1.2.5			
	$10^{-5}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M	$10^{-6}$ M
276	126	280	270	292
sans dinitrophénol	avec dinitrophénol 1.2.6			
	$10^{-5}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M
252	172	246	237	251

1°. on pourrait admettre que l'hydrogène activé ne suit pas le même chemin, suivant que le bleu de méthylène ou respectivement l'oxygène sont les accepteurs.

2°. on pourrait aussi supposer que l'inhibition de la succinodéhydrogénase est beaucoup plus forte en milieu anaérobie.

Remarquons enfin que l'inhibition simultanée de la carboxylase, de la pyruvodéshydrase et de la succinodéshydrase par les dinitrophénols, conduit à admettre dans ces trois ferments l'existence d'un groupement indentique dans la partie protéique du ferment.

Toutes les expériences ont été faites à 38° et ph 7,3.

### Résumé et conclusions.

1°. Les dinitrophénols inhibent la pyruvodéshydrase préparée suivant LONG et PETERS.

2°. Les parties protéiques de la carboxylase et de la pyruvodéshydrase sont caractérisés par certains groupes communs. Ceci est démontré non seulement par l'inhibition causée pour les deux ferments par les dinitrophénols, mais aussi par l'inhibition causée en milieu aérobie par le bleu de méthylène.

3°. L'action de la succinodéshydrogénase est fortement retardée par les dinitrophénols.

4°. La respiration du muscle pectoral du pigeon mesurée d'après la méthode de THUNBERG est inhibée dans les mêmes proportions que la succinodéshydrogénase. Quand on se sert de l'oxygène comme accepteur de l'hydrogène activé, l'inhibition de la respiration principale est 50 à 100 fois moins forte que celle observée lorsqu'on se sert du bleu de méthylène, du moins en ce qui concerne les dinitrophénols 1.2.4 et 1.2.5.

1) L. Vandendriessche, *Enzymol.* **10**, 69 (1941). — 2) L. Massart, R. Dufait, *Enzymol.* **9**, 320 (1941). — 3) C. Long, R. Peters, *Bioch. Jl.* **33**, 759 (1939). — 4) L. Michaelis, V. Moraguez, C. V. Smythe: *Enzymol.* **3**, 242 (1937). — 5) A. v. Szent-Györgyi et coll., *Zs. physiol. Chem.* **236**, 1 (1935). — 6) A. v. Szent-Györgyi, *Studies on biological Oxydations*, Leipzig, 1937. — 7) L. Massart, *Zs. physiol. Chem.* **258**, 190 (1939). — 8) H. von Euler, H. Hellström, *Zs. physiol. Chem.* **252**, 31 (1938). — 9) J. G. Dewan, D. E. Green, *Bioch. Jl.* **32**, 626 (1938). — 10) J. Lehman, *Skand. Arch. f. Physiol.* **58**, 45 (1929).



# Crystalline Peroxidase

(Preliminary communication)

BY

H. THEORELL

(Biochemical Institution of the Medical Nobel Institute, Stockholm)

With 2 figures.

(10.XII.41.)

Since April 1941 we have been able to prepare the classical peroxidase of horse-radish („II", (1)) in crystalline state, in the shape of thin needles of constant composition (fig. 1). By the aid of suitable optical arrangements the crystals can be shown to be double refracting.

The first steps of purification were essentially performed according to ELLIOTT and KEILIN<sup>2)</sup> and KEILIN and MANN<sup>3)</sup>, up to the fractional precipitation of the dialyzed ammonium sulphate precipitate with alcohol. In agreement with the findings of the above-mentioned investigators we obtained preparations of P.N. (purpurogallin number) = 150—200 at this stage. Various adsorption methods employed by WILLSTÄTTER and coworkers<sup>(4)</sup> were tried with little success, so we finally abandoned the adsorption methods and made use of the extremely low migration velocity of the ferment in electrophoretic experiments, even at high degrees of alkalinity, in order to remove faster migrating impurities (polysaccharides, inert proteins, coloured substances). The electrophoresis was followed by fractionation with ammonium sulphate. In most cases the electrophoretic purification had to be repeated once more before homogeneous preparations were obtained. In one preparation 198 kg of horse-radish gave 2.8 g of crystalline ferment, in another 180 kg only yielded 0.5 g, owing to partial destruction of the ferment during electrophoresis at pH 12.

The homogeneity of our crystallized material was ascertained not only by the appearance of crystals, which is no definite proof in the case of proteins, but also by homogeneous migration in the electric field and by the usual tests of solubility in ammonium sulphate solutions. The hemin content of the electro-dialyzed material was 1.48%.\*) The absence of hemin, other than that of the prosthetic group, was proved by reversible dissociation of the peroxidase. The nitrogen content is 18.8%. BIAL's pentose reaction is negative.

The light-absorption curve is similar to that of methemoglobin, and shows maxima at 280, 402, 500 and 640 mμ, with slight intensifications at 380 and 550 mμ. The band at 588 mμ, described by KEILIN and MANN, is absent in pure material.

The light-absorption remains constant from pH 4, the lowest value which is not detrimental to the ferment, to pH 9. At higher values the colour turns red (KEILIN and MANN). We measured the equilibrium-constant:

$$K = \frac{(\text{Fe}\cdots)(\text{OH}')}{(\text{Fe}\cdots\text{OH})}$$

and found the value  $\text{pk}' = 10.90$ . The slope of the logarithmic curve indicates  $n = 1$ . The corresponding dissociation-constant in ferrihemoglobin is 8.15 (AUSTIN and DRABKIN<sup>5)</sup>, CORYELL, STITT and PAULING<sup>6)</sup>).

The P.N. of the crystalline preparations is about 1000. The higher values sometimes reported in the older literature will be discussed in a later paper.

\*) It may be added (2.IV.1942) that ultracentrifugation and diffusion experiments proved the complete homogeneity of the material and gave a molecular weight of 44,100. The minimal molecular weight, calculated from 1.48 % hemin, is 44,000. This peroxidase thus contains one molecule of hemin per molecule<sup>(9)</sup>.

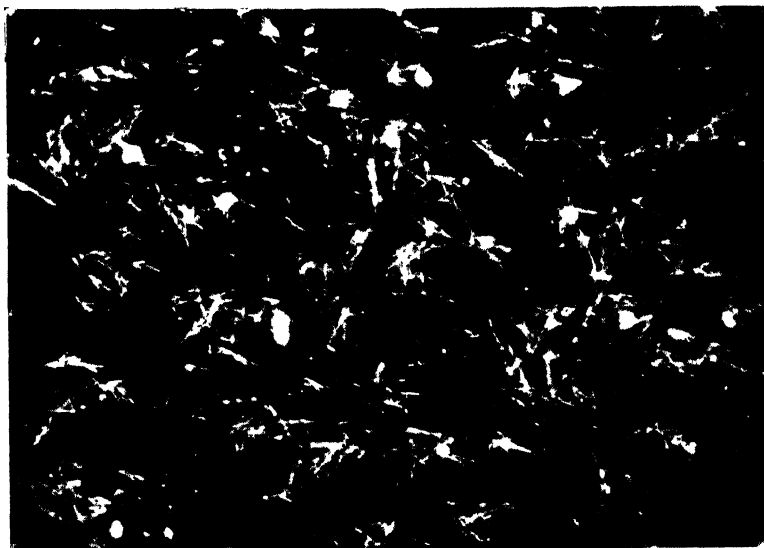


Fig. 1. Peroxidase crystals in dark field, 680 $\times$ .  
Crystallization sets in at a degree of saturation of 55-60% when ammonium sulphate is slowly added to an aqueous-solution of highly purified peroxidase.

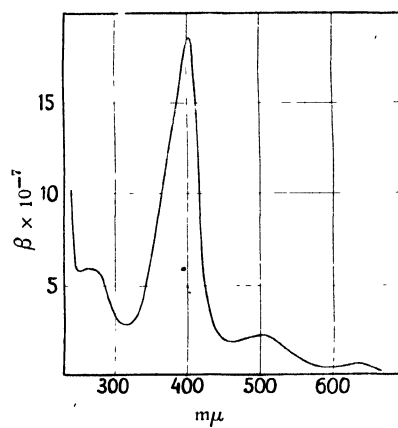


Fig. 2. Light-absorption curve of peroxidase.



The magnetic properties of the peroxidase were determined by the aid of a micro-method worked out here which will be described in a later paper. It was evidently practically impossible to prepare enough peroxidase material for an investigation with the method employed by PAULING and co-workers, which requires 2.5–5 g of hemoglobin for one determination. Owing to the lower hemin content of peroxidase, 7.5–15 g would have been necessary in order to attain the same sensitivity. With our method it was possible to carry out accurate determinations on 0.05 g of peroxidase. The molar paramagnetic susceptibility of peroxidase and some of its derivatives are given in table I.

TABLE I.

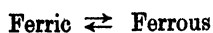
Compound	$\chi_m \times 10^6$ , 20°	Number of odd electrons in Fe.	Analogous compounds of ferri-Hb (PAULING, et al.)	
			$\chi_m \times 10^6$ corr. to 20°	Number of odd electrons in Fe.
Peroxidase, ph 4–9 . . . . .	12,800 $\pm$ 160	5	14,240	5
Alkaline Peroxidase, ph 12.35 . . . . .	4,000	1 ?	8,350	3
Fluoride-Peroxidase . . . . .	14,500	5	14,810	5
Reduced Peroxidase . . . . .	11,400	4	12,470 (horse)	4
Reduced Peroxidase + CO . . . . .	0	0	0	0
SH-Peroxidase . . . . .	2,400	1	2,170	1
CN-Peroxidase . . . . .	3,000	1	2,640	1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Peroxidase . . . . .	< 4,800	1 ?	?	

Despite the close resemblance of the absorption-spectra of peroxidase and ferrihemoglobin, noteworthy differences exist as regards their magnetic properties. Peroxidase in neutral solution has the same susceptibility as cytochrome c at ph 1.3 („type II” (7)). Both values are lower than that for ferrihemoglobin in neutral solution, but approach the value for ferrihemoglobin in somewhat acid solution (8). In alkaline solution the iron in peroxidase is linked by essentially covalent bonds, whereas the iron in alkaline ferrihemoglobin gives an intermediate value, probably corresponding to 3 odd electrons (6).

### Mechanism of peroxidase action.

We have found a hitherto unknown primary addition-compound, formed by equivalent amounts of hydrogenperoxide and peroxidase, which is greenish in colour and characterized by a sharp band at 658  $m\mu$ . Very soon, however, the colour begins to change to red, and the bands at 560 and 590  $m\mu$ , described by KEILIN and MANN as pertaining to „H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase I” appear. Both the green and the red form instantly give the normal peroxidase spectrum on addition of hydroquinone. From these experiments we conclude that the green form is the physiologically active one, because there cannot possibly be enough time available for the formation of the two H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-compounds, described by KEILIN and MANN in the presence of substrates: it should be remembered that the transition-number of peroxidase is of the order of 10<sup>5</sup>–10<sup>6</sup> per minute.

In the systems containing peroxidase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and polyphenols the iron remains in the trivalent state all the time. This type of reaction is not inhibited by carbon-monoxide. However, we were recently able to show that peroxidase acts as an aerobic oxidase, when dihydroxymaleic acid is employed as substrate. This reaction is inhibited by carbon monoxide; the inhibition is very sensitive to light. Reagents which give compounds with ferriperoxidase also inhibit the reaction. A valency change



is thus involved in this reaction, which is both oxidatic and peroxidatic, because

the presence of minute amounts of hydrogen-peroxide is necessary to maintain the oxygen-uptake. It is therefore evident that hydrogen-peroxide can exert a catalytic activity in oxidation processes. It may be of some interest to point out that in the presence of dihydroxymaleic acid peroxidase behaves analogously to WARBURG's oxygen-transmitting ferment, which was characterized by light-sensitive carbon monoxide- and by cyanide inhibition.

The presentation of our experimental material will follow as soon as possible.

1) Theorell, Ark. f. Kemi, Min. o. Geol. (Stockholm) **14 B**, nr. 20 (1940—'41). — 2) Elliott, Keilin, Proc. Roy. Soc. London B, **114**, 210 (1939). — 3) Keilin, Mann, *ibid.* **122**, 119 (1937). — 4) Willstätter, Pollinger, Liebigs Ann. **480**, 290 (1923). — 5) Austin, Drabkin, J. of Biol. Chem. **112**, 67 (1935). — 6) Coryell, Stitt, Pauling, J. Amer. Chem. Soc. **59**, 633 (1937). — 7) Theorell, *ibid.* **63**, 1820 (1941). — 8) Coryell, Pauling, J. of Biol. Chem. **132**, 769 (1940). — 9) Theorell, Ark. f. Kemi, Min. o. Geol. (Stockholm), in print.

---

# Aneurin in cow's and goat's milk

(Preliminary communication)

BY

S. DE JONG

(Laboratory of „Het Nederlandsch Instituut voor Volksvoeding", Amsterdam)

(7.II.42.)

Hitherto only free aneurin was assumed to occur in milk; in fact, the methods (ratgrowth- and thiochrome test) such as they have been used, rendered a distinction between free aneurin, aneurinorthophosphate (AOP) and aneurinpyrophosphate (APP) impossible.

We combined the determination of free and total aneurin by means of the thiochrome-method with the manometric determination of APP (1), and could, in this way, calculate separately the aneurin-, AOP- and APP-content of various samples of goat's and cow's milk (Table I).

TABLE I.

Values for the aneurin-, AOP-, and APP-content of various samples of goat's and cow's milk.

goat's milk			cow's milk		
$\gamma\%$ of aneurin in the form of:			$\gamma\%$ of aneurin in the form of:		
free aneurin	AOP	APP	free aneurin	AOP	APP
11	52	0	34	1	—
12	42	2	32	3	0.5?
17	34	3	27	5	—
12	34	—	25	0	0.5?
9	38	—	26	4	—
13	57	—	26	2	—
18	36	—	24	1	—
14	22	2	28	0	—
10	33	—	20	0	—
17	28	—	27	2	—
11	39	—	32	7	—

These figures indicate that, whereas in cow's milk aneurin is almost completely present in the free form, in goat's milk the greater part may be found as AOP; the presence of APP is difficult to establish: small amounts seem to occur in the latter milk.

In the course of our investigations we could explain the above-mentioned facts by the different action of a phosphatase in cow's and goat's milk: within six hours 200  $\gamma$  of APP, incubated at pH = 6.2 and 27.5° with 40 cc of goat's milk, are completely converted into AOP; the dephosphorylation of AOP proceeds much more slowly; after 24 hours the rise in the free aneurin content of the same reaction-mixture is only 5  $\gamma$ . The same experiment, repeated with cow's milk, yielded an AOP-formation of equal velocity, but the formation of free aneurin — amounting to 90  $\gamma$  after 24 hours — was much higher than in the case of goat's milk.

As the phosphatase, present in goat's udder, produces a rapid dephosphorylation of both APP and AOP, the following assumptions were, in our opinion, justified:

1. aneurin is secreted as APP — the main form in which it is present in animal tissues — and is dephosphorylated afterwards;
2. the difference between goat's and cow's milk is due to the inhibition of the decomposition of AOP in the former.

Preliminary experiments with human milk showed close agreement with goat's milk as regards phosphatase activity, viz. rapid dephosphorylation of APP and slow dephosphorylation of AOP: we could therefore predict the presence of AOP in human milk \*).

As goat's milk and human milk, in contrast to cow's milk, contain hexosephosphoric acids (2), we investigated the influence of hexosediphosphate on both reactions; it appeared that the addition of 20—80 mg% calcium-hexosediphosphate to cow's milk resulted in a marked inhibition of the breakdown of AOP, whereas the dephosphorylation of APP was only very slightly affected. It therefore seems possible that hexosediphosphate alone or in combination with other compounds is responsible for the presence of large quantities of AOP in goat's milk.

1) H. G. K. Westenbrink, D. A. van Dorp, M. Gruber, *Rec. Trav. chim.* **60**, 185 (1941). — 2) G. de Toni, G. Graf, *Zs. Kinderheilk.* **60**, 74 (1938). — 3) W. Neuweiler, *Klin. Ws.* **20**, 1072 (1941).

---

\*) While our experiments were in progress, NEUWEILER 3) published some figures which confirmed our hypothesis: the action of diastase-MERCK on human milk resulted in a higher recovery of aneurin which he — no doubt erroneously — ascribed to the presence of APP.

# On the synthesis and decomposition of aneurin-pyrophosphate by living yeast

(Preliminary communication)

BY

H. G. K. WESTENBRINK AND H. VELDMAN

(Laboratory of Physiological Chemistry, University, Amsterdam)

(20.II.42.)

A short time ago SPERBER<sup>1)</sup> published a note on the synthesis of aneurinpyrophosphate (APP) from aneurin by living yeast. As we had carried out several experiments on the permeability of the yeast cell for aneurin and APP and had made some observations, which seemed to supplement the work of SPERBER, we have now extended our work along similar lines as followed by this author. Though we were able to confirm his observations we do not think his conclusion, viz. the identity of the enzymes decomposing and synthesizing APP, is right. Moreover we have found some remarkable new features of the aneurin metabolism of yeast, which we think worth while to record in this preliminary note.

SPERBER stated that the ph-optimum of the synthesis is situated at about 3.7 and that this reaction is inhibited by 2-methyl-4-aminopyrimidyl-5-methyl-aminodihydrochloride („pyrimidyl“). The present authors, together with VAN DORP and GRUBER<sup>2)</sup> had found previously that APP is converted into aneurin by a yeast phosphatase, possessing a ph-optimum at 3.7 and inhibited by „pyrimidyl“. Combining these facts SPERBER concluded that the decomposition and the synthesis of APP are brought about by the same enzyme.

The case is much more complicated, however. In the living yeast cell APP is not present in free form, but is bound to protein. APP added to living yeast is much more rapidly converted into aneurin than its synthesis takes place (exp. 3). The added APP permeates into the yeast cell (exp. 1) and most of the aneurin which is formed leaves the cell (exp. 2). It then permeates into the cell again, where it is reconverted into APP and bound to protein (exp. 3). As far as our knowledge goes only when linked to protein does APP become resistant to the action of phosphatase<sup>3)</sup>.

The conversion of free APP into aneurin is so rapid that under certain experimental conditions all added APP has disappeared within one minute, while the synthesis of APP from the aneurin formed only attains completion in about one hour (exp. 3). Hence we must conclude that one and the same enzyme cannot bring about hydrolysis and synthesis, for should this be true an equilibrium would immediately be reached, whether starting from APP or from aneurin.

Our most remarkable finding, however, is the following: the synthesized APP is not bound to apocarboxylase, though it is present in a form in which it is not readily attacked by the phosphatase. For though the APP content may be increased to about 1700% of the amount originally present, the carboxylase activity of the yeast, when dried, has not increased (exp. 4).

## Experiments.

Our work was carried out with bakers' yeast („Koningsgist“) from the „Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek“, Delft.

### Experiment 1.

The experiment, described by table I, proves that the medium, in which fresh living yeast is suspended, contains some phosphatase. Probably this phosphatase originates from damaged cells, for when the yeast is repeatedly washed, the second washing fluid already contains much less than the first one, while the phosphatase contents of the third and the fourth washing fluids are negligible. Yet the APP added to the washed cells is readily decomposed; so we must conclude that the APP permeates into the cells, where it is decomposed.



TABLE I.

APP was determined in:	$\gamma$ of APP	
	per g of yeast	per 5 cm <sup>3</sup> of fluid
I. fresh yeast . . . . .	13	
II. a suspension of 1 g of yeast in 5 cm <sup>3</sup> of 0.1 mol. primary phosphate (ph 4.5), which had been left standing at 15° C for 90 minutes after the addition of 50 $\gamma$ of APP . . . . .	13	
III. the centrifugates, obtained from repeatedly washing 3 g of yeast with 15 cm <sup>3</sup> of prim. phosphate, 30 min. after the addition of 50 $\gamma$ of APP to 5 cm <sup>3</sup> of centrifugate (15° C),		
1st centrifugate . . . . .		0
2nd " . . . . .		35
3rd " . . . . .		60
4th " . . . . .		60
IV. the washed yeast cells, suspended in 15 cm <sup>3</sup> of prim. phosphate, 30 minutes after the addition of 50 $\gamma$ of APP per 5 cm <sup>3</sup> of suspension (15° C) . . . . .	13	

## Experiment 2.

1 g of yeast was washed 4 times with 5 cm<sup>3</sup> of prim. phosphate. The washed cells were suspended in 5 cm<sup>3</sup> of this solution and 50  $\gamma$  of APP were added. After standing for 5 minutes at 15° C, the suspension was centrifuged and aneurin was determined in cells and centrifugate separately. The cells contained 2  $\gamma$  and the centrifugate 25  $\gamma$  of free aneurin.

## Experiment 3.

4 g of yeast were incubated in 36 cm<sup>3</sup> of 0.1 mol. succinate buffer, ph 3.7, at 27.5° C. 300  $\gamma$  of APP were added and samples were pipetted at 30'', 20', 40', 60' and 90' after the addition of the APP. APP determinations gave the following results:

Time:	30''	20'	40'	60'	90'
$\gamma$ of APP per g of yeast:	14	34	68	68	78

So we see that the APP added is completely decomposed within one minute and that the re-synthesis of APP is a much slower process.

## Experiment 4.

4 mg of aneurin were added to 14 g of yeast, suspended in 126 cm<sup>3</sup> of succinate buffer, ph 3.7. The suspension was shaken for 16 hours at 27.5° C. The yeast was separated by centrifuging, washed 3 times with water and dried at room temperature in a thin layer on a glassplate (yeast I). The dry yeast contained 560  $\gamma$  of APP per g, while a sample of the original yeast, non-treated with aneurin and dried in the same way, only contained 34  $\gamma$  of APP per g (yeast II).

Carboxylase determinations were carried out in the following way: the main compartments of WARBURG-bottles contained a few mg of dried yeast, suspended in 1.5 cm<sup>3</sup> of 0.1 mol. phosphate buffer, ph 6.2. 5 mg of Na pyruvate, dissolved in 0.2 cm<sup>3</sup> of the buffer, were tipped in from the side bulb. The results are given by the following table:

	Yeast I		Yeast II	
	2.5 mg	5 mg	2.5 mg	5 mg
CO <sub>2</sub> production in 28 min. (mm <sup>3</sup> ): . . .	86	133	95	182

So we see that the carboxylase activity of yeast I was rather lower instead of higher than that of yeast II.

1) E. Sperber, Naturwiss. 29, 765 (1941). — 2) H. G. K. Westenbrink, D. A. van Dorp, M. Gruber, H. Veldman, Enzymol. 9, 79 (1940). — 3) H. G. K. Westenbrink, A. F. Willebrands, Chr. E. Kamminga, Enzymol. 9, 228 (1940).

# On the ratio between the uptake of carbon dioxide and of the hydrogen donor in purple sulphur bacteria

BY

E. C. WASSINK

(Biophysical Research Group under the Direction of L. S. Ornstein†, Utrecht,  
and of A. J. Kluyver, Delft).

With 10 figures.

8th Communication on Photosynthesis \*)

(16.VI.41)

## § 1. Introduction.

In a previous study on photosynthesis of purple sulphur bacteria (EYMERS and WASSINK<sup>1)</sup>), the amount of carbon dioxide actually assimilated in the presence of thio-sulphate has been determined. The uptake of carbon dioxide was measured with the manometric method of WARBURG. The chief difficulty, to be overcome, was the determination of the additional uptake of carbon dioxide by the suspension medium, due to free metal ions, remaining from consumed molecules of the donor.

The present paper deals with the determination of the ratio of the amounts of carbon dioxide and of hydrogen donor taken up in photosynthesis. In § 2 experiments with gaseous hydrogen donors have been described; in § 3 experiments concerning the direct determination of the ratio thiosulphate : carbon dioxide are reported.

The organism used, was the same as in the previous study (1), viz., *Chromatium*, strain D. Photosynthesis was again measured manometrically with the WARBURG-technique, using single manometers, and conical vessels with 2 sidebulbs without central well. For a detailed description of the experimental procedure and of the culture-method of the bacteria, we refer to the paper of WASSINK, KATZ and DORRESTEIN, to be published shortly (2), and to (1).

With gaseous hydrogen donors the manometrically measured uptake of gas consists partly of donor, partly of carbon dioxide. Without further measures the separate amounts of each gas can not be established. However, a determination of these amounts is possible, if from one of the two compounds of the gas exchange, donor or carbon dioxide, only a known, limited amount is supplied, which then is allowed to be consumed completely during the experiment. In this case an uptake will result, surpassing the amount of gaseous compound added. On the assumption that all gas added has actually been consumed in photosynthesis, the surplus corresponds to the quantity of the other compound, simultaneously assimilated. In this way the ratio donor : carbon dioxide can be established.

As far as we know, this ratio has been determined only in the case of hydrogen with *Athiorhodaceae* (GAFFRON<sup>3)</sup>, WESSLER and FRENCH<sup>4)</sup>, NAKAMURA<sup>5)</sup>). These authors added a known amount of carbon dioxide in the form of a weighed quantity of carbonate from a side bulb to the suspension of bacteria in phosphate buffer. The carbon dioxide was allowed to be assimilated in the presence of hydrogen. With the aid of this method GAFFRON determined the ratio  $H_2 : CO_2 = 2$  (1.85—2.25) for *Rhodovibrio*, whilst WESSLER and FRENCH arrived at the value 2.6 (2.3—2.9) for *Streptococcus varians*. Without referring to the method applied, and without giving the limits of experimental error, NAKAMURA<sup>5)</sup> reports to have found  $H_2 : CO_2 = 2$  for *Rhodobacillus palustris*.

\*) 1st Comm.: Enzymol. 2, 258 (1938); 2nd: ibid. 4, 254 (1937); 3rd: ibid. 5, 100 (1938); 4th: ibid. 5, 110 (1938); 5th: ibid. 6, 145 (1939); 6th: ibid. 7, 97 (1939); 7th: ibid. 7, 113 (1939).

The possibility of applying this method of dosage is limited; it is practically restricted to carbon dioxide in a gas phase containing hydrogen. Perhaps it may be used also in the case of  $\text{H}_2\text{S}$  added as  $\text{Na}_2\text{S}$  or  $\text{NaHS}$  in a gas phase containing carbon dioxide. However, preliminary experiments have taught us that in this case serious complications arise. Moreover, a general drawback of this method is the remaining of alkali-ions, which leads to complications unless the dosages are restricted to very small quantities. Then, however, corrections for „auto-assimilation” may become undesirably important.

For these various reasons we have applied another method of dosage, viz., dosage as a gas, which could conveniently be used in the cases of  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  and  $\text{H}_2\text{S}$ .

As far as we know, up to the present time this principle has been used in the study of photosynthesis only once, viz., by EMERSON and GREEN <sup>6)</sup> in a study on the influence of the pressure of carbon dioxide upon the rate of photosynthesis in *Chlorella*. These investigators introduced a certain amount of carbon dioxide into a vessel containing the cell suspension and determined the rate of photosynthesis manometrically in the course of the experiment. In this way the decrease in carbon dioxide pressure could be computed and the relation between pressure and rate of carbon dioxide consumption could be derived from these data.

## § 2. The manometric determination of the amount of carbon dioxide assimilated in photosynthesis with gaseous hydrogen donors.

So far we have applied the dosage technique to be described, to carbon dioxide, hydrogen, and hydrogen sulphide. In the case of  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2$  we have taken the gas directly from a steel flask, in the case of  $\text{H}_2\text{S}$  from a generator containing  $\text{HCl}$  and  $\text{FeS}$ , after passing the gas through a washing bottle with 1%  $\text{Na}_2\text{S}$ -solution.

The dosage procedure runs as follows. The suspension liquid of the bacteria was phosphate buffer, pH 6.3, with  $\text{NaCl}$  (1). During filling, the WARBURG-vessels were attached to the manometers, and a suitable gas was flowing through, e.g.  $\text{N}_2 + 5\%$   $\text{CO}_2$  in the case of dosage of  $\text{H}_2$  or  $\text{H}_2\text{S}$ , and  $\text{N}_2 + 15\%$   $\text{H}_2$  in the case of dosage of  $\text{CO}_2$ . After the filling is ready, the manometers are placed into the thermostat and allowed to reach temperature equilibrium; excess gas is allowed to escape. Meanwhile the container of dosage-gas is connected with a long capillary tube and the gas is allowed to pass on slowly. After sufficient time to assure that the tube is completely filled with the gas, it is connected with the closed leg of one of the WARBURG-manometers; thus the top of this leg and the 3-way-tap are ventilated with the gas. The capillary tube is bent in such a way that it extends from the valve of the steel flask to the top of the manometer. Now the manometer and the thermobarometer are read and then the gas is carefully let in. When care is taken that the stream of gas through the tube is not too fast, it is easily possible to obtain every dosage wanted. After closing the tap, the manometer liquid in the closed leg is brought again to the initial level and the manometer is read again. The difference in pressure as compared with the first reading is due to the gas introduced, the amount of which is easily calculated by multiplying the difference in levels with the vessel constant for the gas in question. With a vessel constant of ca. 2 the maximum dosage, easily to be handled is of the order of 600 mm, i.e. 3% of the gas phase. Readings to other levels than to the usual 18.00 can not be avoided in the case of larger dosages, but as far as our experience goes, this does not interfere with an exact calculation.

It should be noticed that the gas, present in the boring of the tap is that of the initial gas phase, and that this gas is also introduced into the manometer. Therefore the content of the boring must be subtracted from the calculated volume of gas added. The remainder actually consists of the gas added. With very small dosages, amounting to less than twice the content of the boring, rather serious errors may result, probably due to mixing within the boring. In our manometers the boring had a content of ca. 50 mm.

Supplying large dosages it often becomes necessary to introduce some additional „initial” gas during the experiment because otherwise the level in the manometer-tubes comes beyond the scale. This can be done in the same way as the „dosage” gas has been supplied. In such a case it has to be noticed, however, that now the boring of the tap is filled with the dosage-gas, so that a dosis of this gas is introduced at the same time.

We read the manometers immediately after the dosage-gas has been introduced. At this moment as a rule an equilibrium of the added gas with the liquid in the manometer vessel will not yet be attained. But, since the partial pressure of the gas added is very low, the error made in this way does not surpass the limits of accuracy of the method. Only with relatively high doses of very soluble gases like  $\text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{S}$  it is necessary to make an additional reading after some minutes of shaking and to calculate the amount of gas from this reading with the „vessel constant” for the gas supplied.

For the experiments under discussion we have used 5—7 manometers; the illumination was the highest possible with our Na-lamp, i.e. ca.  $2.5 \cdot 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. The various manometers received increasing amounts of gas; in each series one manometer did not receive any gas, in order to estimate

the gas exchange due to the auto-assimilation. Mostly another manometer was supplied with an excess of the gas in question, in order to check the activity of the cells under optimal conditions.

After the gas had been supplied and the manometers were shaken for some 5–10 minutes in the dark to attain equilibrium, the light was admitted. Then readings were made every 5 minutes, later on every 10 minutes.

Figs. 1–3 give examples of the course of the readings in experiments in which various amounts of hydrogen, hydrogen sulphide, and carbon dioxide were supplied. In the case of hydrogen also a control with 15%  $\text{H}_2$  (30.0 cm) is shown. In the same figures graphs of the extrapolated initial rate against the amount of gas admitted have been given; at low concentrations proportionality exists in all cases. With carbon dioxide, saturation is reached at the highest dosis supplied. We have also calculated the gas exchanges in the first half hour of the experiment. As these show in principle the same relation as the extrapolated values for time zero they have

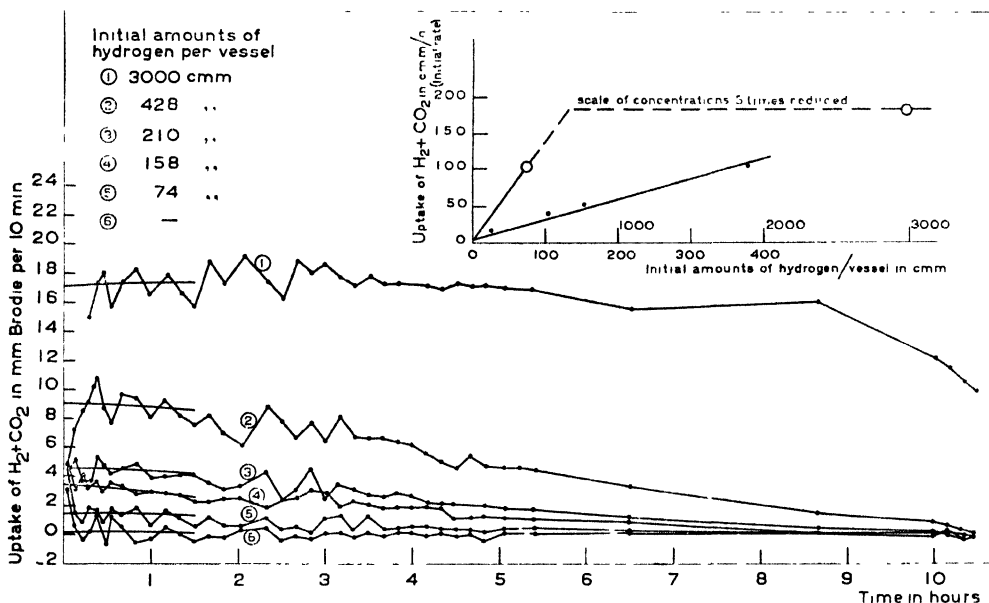


Fig. 1. Initial rate and course of gas uptake with various amounts of hydrogen ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.3, 29°, high light intensity). Exp. of 24.10.'39.

not been presented. In the case of hydrogen sulphide, however, the initial rates showed rather important deviations from proportionality in the case of high doses (see below). As long as proportionality of the rate of photosynthesis with the initial concentration is observed, the supply of the dosage gas from the gas phase controls the brutto reaction velocity of the photosynthetic process. This also follows from the fact that in these cases the readings immediately begin to decrease with time. In the case of hydrogen this decrease is very gradual, in the case of the more soluble gases the initial rates are higher and the decrease is steeper. As indication that the amount of gas supplied has been consumed, has been taken that the readings equal those in the control without gas supply. At this point the experiment was finished.

We still wish to draw attention to a few additional features. In the case of  $\text{H}_2\text{S}$  (fig. 2) the higher doses mostly start with an additional gas uptake. As far as could be ascertained the ratio between hydrogen sulphide and carbon dioxide taken up in this part of the experiment does not deviate from that in the remaining course of the experiment. The curves extrapolated to time zero, leaving out of consideration the exceptionally high readings at the beginning, yield rates which are linear to the concentration. This strongly suggests that these high readings are something „additional“, disappearing in the stationary state of illumination. In some cases, however, they lasted rather long, viz., about 1 hour for the highest dosis, which suggests that an effect of biological character is involved.

The strong extra gas uptake shown in the graph for carbon dioxide (fig. 3) is worth noting. At

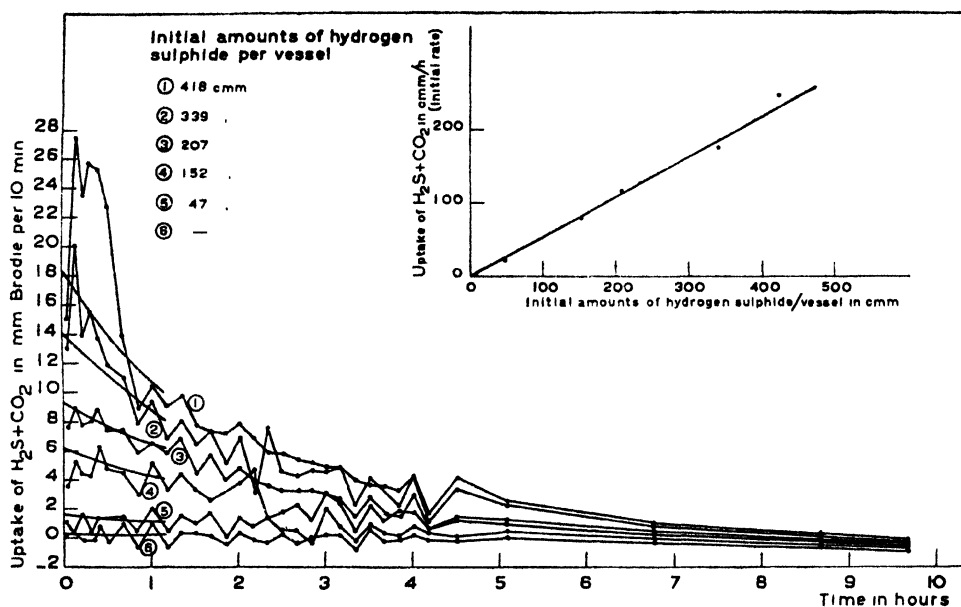


Fig. 2. Initial rate and course of gas uptake with various amounts of hydrogen sulphide ( $CO_2$  5%, pH 6.3,  $29^\circ$ , high light intensity). Exp. of 30.10.'89.

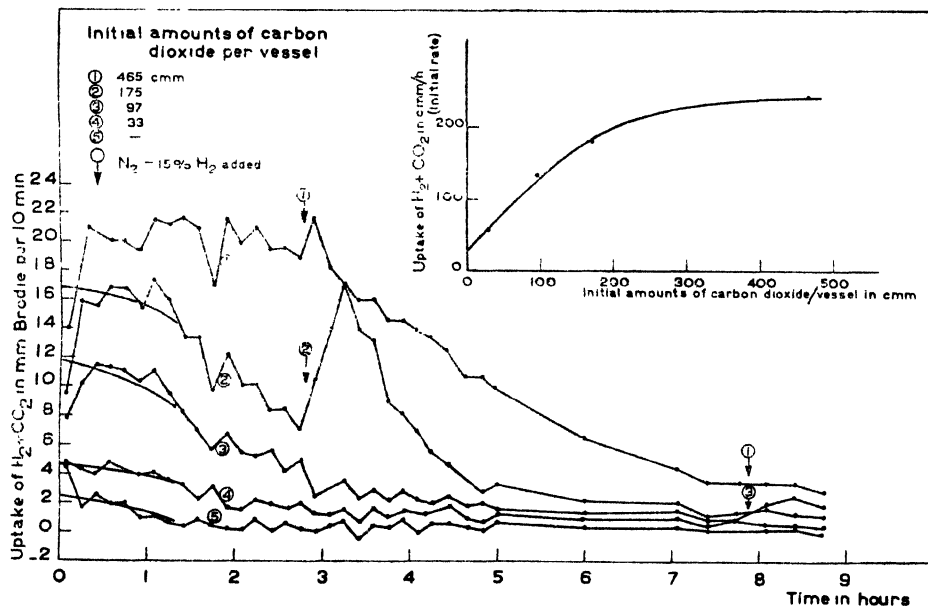


Fig. 3. Initial rate and course of gas uptake with various amounts of carbon dioxide ( $H_2$  15%, pH 6.3,  $29^\circ$ , high light intensity). Exp. of 19.10.'89.

the moment indicated by an arrow the two highest doses received an additional amount of „initial gas” in order to allow further reading of the manometer. Now the content of the boring of the tap, containing „dosage gas” (carbon dioxide) was introduced into the gas space, causing the extra uptake. That it is only observable in the second curve and not or much less in the highest one, will be due to the fact that in the latter case the readings were not yet dependent on the concentration of carbon dioxide. In the second curve the surface of the extra uptake practically covers the amount of gas to be expected from the quantity of carbon dioxide introduced, *viz.*, about  $3 \times 50 = 150$  cmm (*cf.* below).

As a rule the gas exchange in the control vessel was found to be very small, especially in experiments in which the donor-gas was dosed, so that in the control vessel only CO<sub>2</sub> could be taken up. As various other parts of our work were connected with properties of the donor-action in photosynthesis (2) we have taken special measures to obtain bacteria with as little „cellular donors” as possible, in other words bacteria with the least possible auto-assimilation For

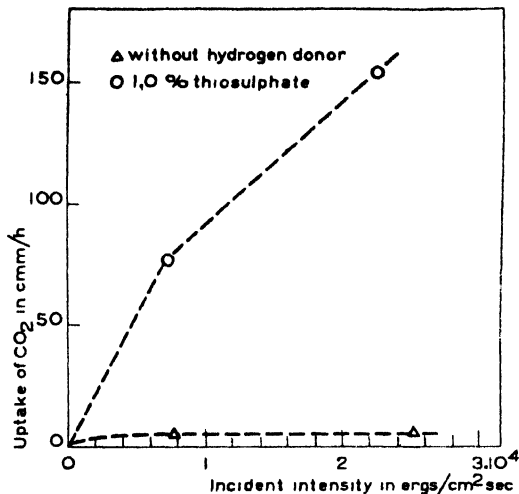


Fig. 4. Effect of the addition of a hydrogen donor upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, pH 6.3, 29°). Exp. of 8.9.'39.

this reason the bacteria were previously submitted to a „starvation” process.

They were centrifuged from the culture-medium (1, 2), and suspended again in the same medium, however, without thiosulphate or malate. In this medium they were kept for ca 16 hours in the light cabinet at about 29° in order to make them use up stored food substances. In the absence of a hydrogen donor these bacteria did indeed not show an appreciable gas exchange when illuminated under the conditions of our experiments (*cf.* fig. 4).

Later on, however, we observed that also without this treatment our bacteria behaved much in the same way. As the starvation caused a decrease in activity, it was in the later experiments mostly omitted, which was the more acceptable as in the experiments dealing with dosage of donor a blank was always run simultaneously with the vessels that had received hydrogen donor. Various authors have reported a larger auto-

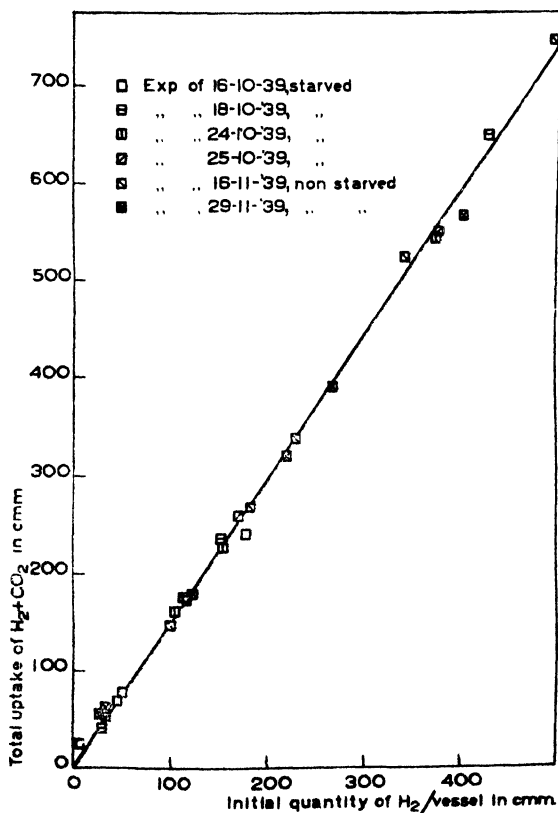


Fig. 5. Total uptake of hydrogen and carbon dioxide with various initial amounts of hydrogen (CO<sub>2</sub> 5%, pH 6.3, 29°, high light intensity). Corrected for (small) gas uptake of blank. Exps. of various dates.

assimilation than we found (e.g. VAN NIEL<sup>7</sup>). It is difficult to tell what are the reasons for this difference. It may partly be due to the fact that we use very small amounts of bacteria per vessel and perhaps also to the use of phosphate buffers of pH 6.8 as suspension media.

In many experiments it took 8–10 hours before the gas supplied was consumed. The low doses were somewhat sooner exhausted than the high ones, but the difference is not very large, due to the fact that the rate of gas exchange is about proportional to the initial pressure.

In most cases the activity of the bacteria did not remain constant during these experiments of long duration, but nevertheless it always remained satisfactory.

In order to check this point sometimes dosage-gas was supplied in excess at the end of an experiment to vessels with low doses. In these cases immediately a rapid uptake of gas took place, indicating that the bacteria had stood the lasting exposure to the light very well.

We have dealt with the data of an experiment as follows. For each dose the corresponding total uptake of gas was presented in a plot dose—uptake. It was always found that the points could be connected by a straight line. So the ratio of the amounts taken up of the gas dosed and of that present in excess was not systematically dependent on the amount of gas dosed, in other words this ratio was constant in the range of doses studied. A slight scattering of the points was observed; also a few larger deviations occurred. The straight line was drawn so as to fit in the best way the various points. The slope of the line was taken as yielding the value of the ratio. In this way the ratio obtained is an average derived from the whole experiment comprising 5–7

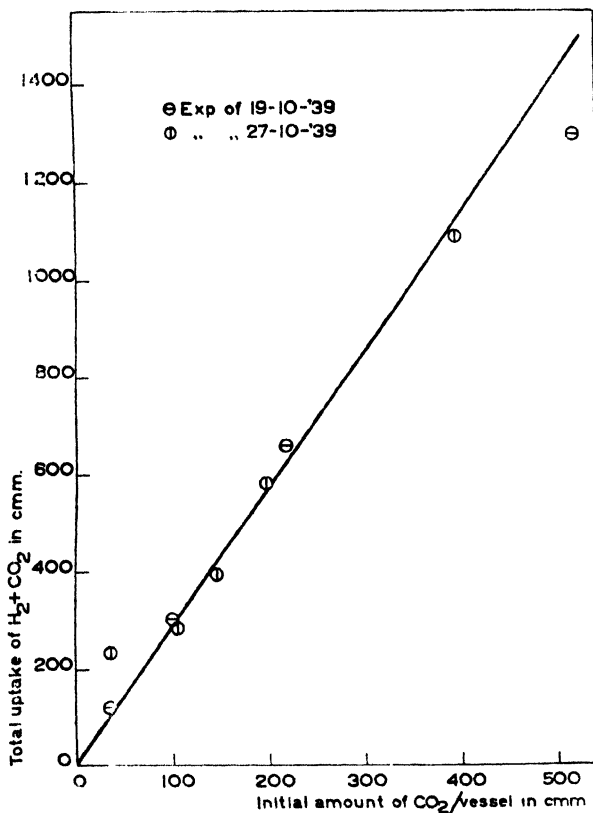


Fig. 6. Total uptake of hydrogen and carbon dioxide with various initial amounts of carbon dioxide ( $H_2$  15%, pH 6.8, 29°, high light intensity). Corrected for (small) gas uptake of blank. Exps. of various dates.

doses. In order to eliminate the auto-assimilation all values of total gas uptake have been corrected for the small value observed in the vessel without gas supply i.e., all curves start in 0. All data relating to the same type of experiment have been plotted in the same graph, allowing a still more accurate establishment of the ratio in question. For the various types of experiments performed these graphs are represented in figs 5–7.

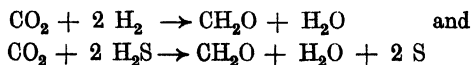
In table I all values derived in this way from the various experiments have been collected. Thus the following average values for the ratio's studied were found:

$$\begin{aligned} H_2 : CO_2 (H_2 \text{ dosed}) &= 2.18 \pm 0.10 \\ H_2 : CO_2 (CO_2 \text{ dosed}) &= 1.95 \pm 0.10 \\ H_2S : CO_2 (H_2S \text{ dosed}) &= 1.97 \pm 0.10 \end{aligned}$$

The experiment with dosage of  $\text{H}_2$  of 16.10.'39 gave a value deviating widely from the other ones. However, here only a few low doses were applied (max. 150 cmm); therefore this value has been discarded in the computation of the average. The same holds for a few experiments in which  $\text{CO}_2$  was dosed as sodium carbonate. Here the ratio  $\text{H}_2 : \text{CO}_2$  was found lower than in the other experiments. However, here the amount of carbon dioxide added was low, whereas moreover only few doses were given in each experiment. In our opinion also these values are less trustworthy, and they have not been averaged together with the other ones.

Although only a relatively small number of experiments has been carried out so far, the data collected in Table I show sufficiently that both the ratios  $\text{H}_2 : \text{CO}_2$  and  $\text{H}_2\text{S} : \text{CO}_2$  closely approach the value 2.0 under the

conditions of our experiments. This suggests that the main conversions taking place in the course of the experiments may be represented by the simple equations:



Additional evidence in favour of the latter equation was obtained by the fact that at the end of the experiments in which hydrogen sulphide was supplied, the cells showed a whitish appearance due to stored sulphur, which could be seen microscopically as the well-known highly refractive globules within the cells. Moreover a relation between the amount of sulphur stored and the amount of  $\text{H}_2\text{S}$  added, was obvious.

A determination of the amount of sulphur in relative units was performed with the aid of our equipment for absorption measurements. A glass box was filled with the suspension of bacteria used in the experiment, and the light transmitted measured with the photocell in such a way that only light transmitted or scattered under angles less than  $1^\circ.5$  was caught by the cell.

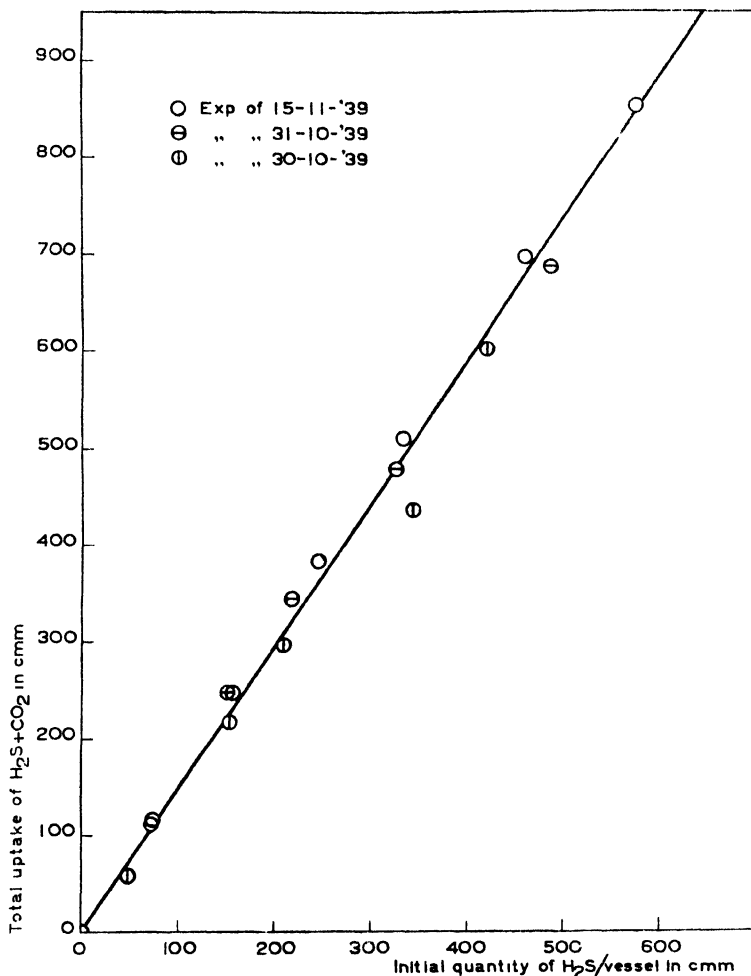


Fig. 7. Total uptake of hydrogen sulphide and carbon dioxide with various initial amounts of hydrogen sulphide ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.3,  $29^\circ$ , high light intensity). Corrected for (small) gas uptake of blank. Exps. of various dates.



TABLE I.

Ratio of the amount of hydrogen or hydrogen sulphide and the amount of carbon dioxide taken up simultaneously.

Date	Compound in excess	Compound dosed	Ratio	Number of dosages from which ratio was established	Remarks
11.10.'39	H <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 1.76	2	Excluded from averaging as only related to a few low dosages.
12.10.'39	H <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 1.72	2	
13.10.'39	H <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 1.74	2	
16.10.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 2.85	2	
18.10.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 2.00	4	Average H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 2.13 ± 0.10
24.10.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 2.35	4	
25.10.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 2.20	4	
16.11.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 2.05	6	
29.11.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 2.25	5	
19.10.'39	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 2.05	4	Average H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 1.95 ± 0.10
27.10.'39	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> : CO <sub>2</sub> = 1.85	4	
30.10.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S : CO <sub>2</sub> = 1.90	4	Average H <sub>2</sub> S : CO <sub>2</sub> = 1.97 ± 0.10
31.10.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S : CO <sub>2</sub> = 2.20	5	
15.11.'39	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> S	H <sub>2</sub> S : CO <sub>2</sub> = 1.80	6	

Thus the amount of sulphur was determined upon the basis of its property of scattering the light. The determination was made for two wavelengths, in which the bacteria do not show strong absorption, *viz.*, at 9600 Å, beyond the region of pigment absorption, and at 7100 Å, in a region of low absorption. In fig. 8 the

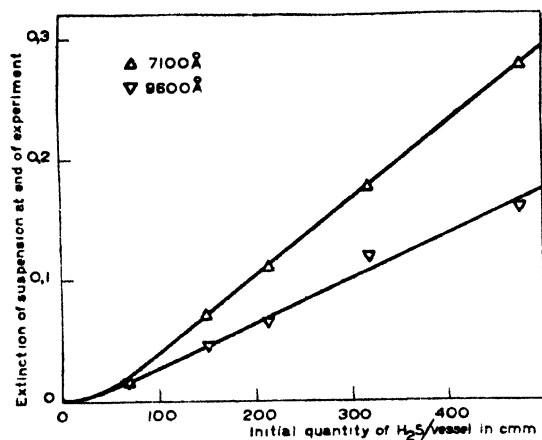


Fig. 8. Increase in light extinction of a suspension as caused by varying sulphur content in relation to the amount of hydrogen sulphide supplied.

extinction  $\log \frac{I_0}{I}$  has been plotted against the amount of hydrogen sulphide, initially present. A linear relation is obtained for both wavelengths. A determination of the amounts of sulphur in absolute values was not made.

Our chief aim with the experiments reported until now was to establish also for further experiments the amount of carbon dioxide assimilated, from a reading including also donor consumption. We believe to be right in accepting this amount to be 1/3 of the total reading in cases in which hydrogen or hydrogen sulphide served as hydrogen donors. This holds strictly speaking only for the conditions concerned, *viz.*, for pH 6.3 and

temp. 29°. The determinations were made as a part of a more extensive study (2) in order to enable the interpretation of the gas exchange. In this study also experiments at other temperatures and at other pH-values were included, but so far we have not determined the ratios CO<sub>2</sub> : hydrogen donor in those cases.

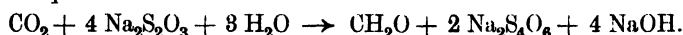
Before concluding this section a few remarks may still be made. Figures 1—3 have shown that the dosage of gaseous compounds taking part in photosynthesis is not only useful in determining ratios of consumptions but also in studying the dependence of the velocity of the process upon low concentrations of those compounds. In the case of carbon dioxide e.g. this method is strongly preferent above the method of limiting the available carbon dioxide by the use of carbonate mixtures of increasing ph. When applying the latter method one has to take into account the possible unfavourable influence of high ph-values upon the cells, and in the case of purple sulphur bacteria perhaps also upon the reactive sulphur compounds. Moreover there is evidence that the cells of suspended unicellular organisms can also assimilate carbon dioxide, supplied in the form of bicarbonate-ions, so that the purpose is not reached.

EMERSON and GREEN <sup>6</sup>) have devoted a detailed study to this question in the case of *Chlorella* and also arrive at the conclusion that the very alkaline carbonate-bicarbonate mixtures show accessory unfavourable influences. It may be remarked that the study of carbon dioxide limitation of photosynthesis is easier in purple sulphur bacteria than in green organisms, as in the former case no simultaneous evolution of gas takes place, a drawback emphasized for *Chlorella* by EMERSON and GREEN. Moreover, it seems to us that in our bacteria the rate of photosynthesis is limited by the pressure of carbon dioxide up to a much higher pressure than with EMERSON and GREEN's *Chlorella*. This agrees with an observation of FRENCH <sup>8</sup>) on *Athiorhodaceae*, who finds saturation with carbon dioxide at a pressure somewhat above 1% of the gas atmosphere. Also the longer range of limiting pressures makes the use of purple bacteria advantageous over that of *Chlorella* for the study of carbon dioxide limitation. However, our observations on the rate of the process had only an incidental character in the present study.

The method of dosage may also be useful in the study of the chemism of photosynthetic reactions in purple bacteria in which only one compound is a gas. An example is presented in the following section. GAFFRON <sup>3</sup>) also reports observations along this line in connection with the use of organic substrates by *Athiorhodaceae*.

### § 3. On manometric determination of the conversion of thiosulphate by purple sulphur bacteria.

With chemical methods STARKEY <sup>9</sup>) studied the metabolism of colourless sulphur bacteria in growing cultures in the presence of thiosulphate, and found this compound to be chiefly converted into polythionates, especially tetrathionate. VAN NIEL <sup>7</sup>) gave as his opinion that the same will hold for purple sulphur bacteria. Assuming that tetrathionate will be chiefly formed, a molecule of CO<sub>2</sub> requires 4 molecules of thiosulphate to become converted into carbohydrate according to the equation:



The 4 molecules of sodium hydroxyde formed will give rise to a binding of 4 molecules of carbon dioxide in non-buffered media. Actually a value of 3.41—3.78 was found (1). This indicates that indeed the main conversion does not deviate much from the equation given. We have now also measured directly the amount of thiosulphate converted per molecule of CO<sub>2</sub> assimilated, with the aid of dosage experiments.

In an analogous way as in the experiments reported in the preceding section, various amounts of thiosulphate were supplied in a series of 5—7 vessels and allowed to be completely consumed. The suspension medium was again phosphate buffer of ph 6.3, containing NaCl, temp. 29°, the gas phase was N<sub>2</sub>—5% CO<sub>2</sub>, the Na-light intensity was the highest obtainable with our equipment. For the same reasons as outlined in the preceding section a vessel without and one with excess of thiosulphate were run together with the others. Fig. 9 shows the course of the readings with time; the curves have about the same character as in the case of CO<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>S, the decrease with time being still more pronounced. With low concentrations also here the rate of photosynthesis is directly limited by the external concentration. In fig. 9 also the relation of the rate of photosynthesis towards concentration is given for the values extrapolated to time zero. In general the curve obtained from the readings for the first half hour showed a less sharp bent between the regions of limitation and saturation. Of course the values in fig. 9 could not be corrected for extra chemical uptake by the medium. This does not appreciably influence the results, since the phosphate buffer prevents any considerable uptake as long as the amount of sodium ions liberated is small.

However, for the determination of the ratio thiosulphate: carbon dioxide it was necessary

to determine also the chemical uptake of carbon dioxide by the medium. Therefore the amount of carbon dioxide initially present in the solution in a bound form, and also the amount present at the end of the experiment were determined. In all cases the values have been corrected for that obtained in the thiosulphate-free medium. Therefore, only the final value of bound carbon dioxide, in the vessel without and in the vessels with thiosulphate have to be taken into consideration for the calculation of the changes in bound carbon dioxide, due to the assimilation of thiosulphate. The determinations were made in the way described for-

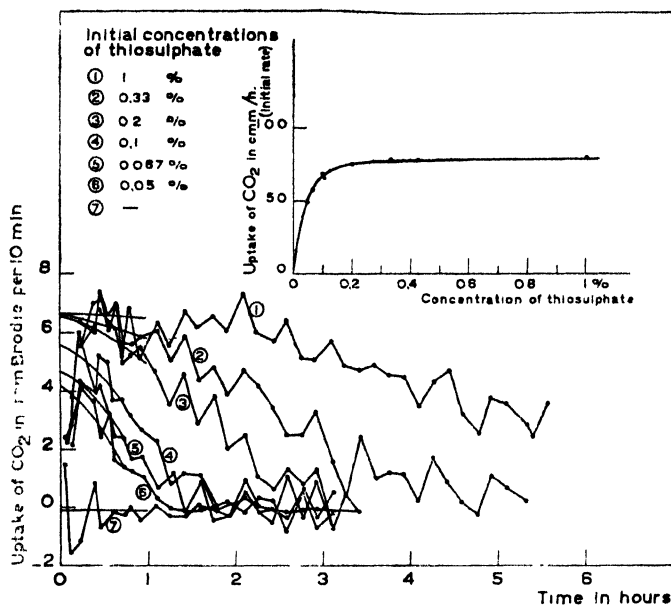
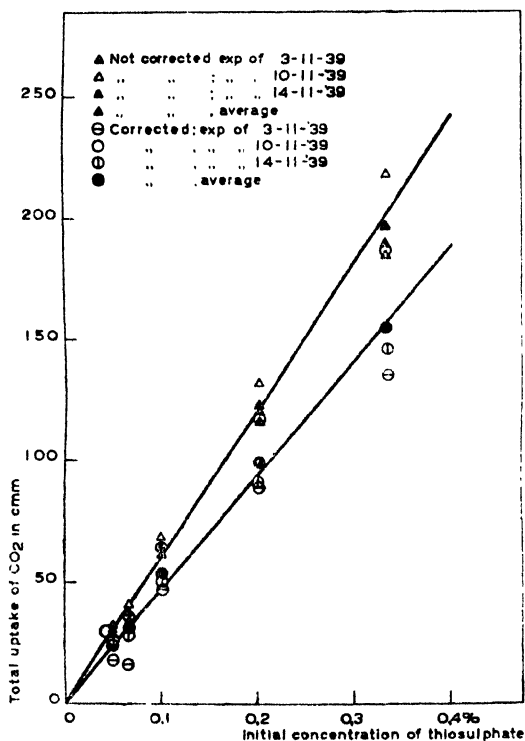


Fig. 9. Initial rate and course of gas uptake with various amounts of thiosulphate ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.3, 29°, high light intensity). Exp. of 14.11.'39.



merly (1), with the aid of citric acid. The results of 3 experiments have been collected in fig. 10.

Two sets of points, each yielding an average curve, have been given, viz., an average curve for the values directly obtained from the manometric readings and one obtained after correction of these values for the chemical uptake of carbon dioxide by the medium. Only the latter values are important for the discussion. The average ratio  $\frac{\text{thiosulphate}}{\text{carbon dioxide}}$  thus found, amounts to 3.75; for the three experiments represented it was 4.0 (exp. of 8.11.'39), 8.2 (10.11.'39), 8.9 (14.11.'39). According to the equation discussed above this ratio will be the same as the ratio  $\frac{\text{carbon dioxide extra bound}}{\text{carbon dioxide assimilated}}$  in non-buf-

Fig. 10. Total uptake of carbon dioxide with various initial amounts of thiosulphate ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.3, 29°, high light intensity). Corrected for (small) gas uptake of blank. Without and with correction for chemical uptake of carbon dioxide (see text). Average values of 3 experiments.

ferred media. In this respect a good agreement with our data concerning the latter ratio (1) is obtained.

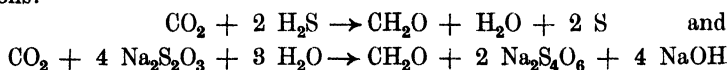
The bacteria with the largest deviation from the theoretical value (exp. of 10.11.'39) showed the highest activity; apparently these bacteria had a stronger tendency to bring about a farther reaching conversion of the substrate. In the two other experiments the value obtained with the highest dosis lies slightly below the line fitting best the values for the lower doses, which means that here the ratio thiosulphate: carbon dioxide is somewhat higher than the average of the experiment. With the lower doses there is perhaps a slight tendency to concurrent reactions, although for the duration of our experiments the deviations remain small.

Just as was the case with the experiments reported in the preceding section, we have not yet studied the various questions involved in greater detail. The experiments reported show once more the applicability of the manometric method in relation with dosage-series also for the study of conversions of non-gaseous substances in metabolic processes.

#### § 4. Concluding remarks.

From the results discussed in the preceding sections we wish to emphasize the observation that nearly always the values for the ratio carbon dioxide : hydrogen donor, derived from measurements at increasing doses in the same experiment, were independent of the dosis applied.

VAN NIEL <sup>7)</sup> has pointed out that in bicarbonate media strongly different readings may represent about the same metabolic rate but are due to different reaction mechanisms. It was already demonstrated in detail before <sup>(1)</sup> that the danger for completely erroneous conclusions is much diminished by the use of phosphate buffers. In the dosage experiments a decrease of the readings is observed but when analogous points are considered, we find in all cases the same ratio carbon dioxide: hydrogen donor. Thus the same bruto reaction mechanism is encountered independent of the initial amount supplied of a compound involved in the reaction. In the case of dosage of hydrogen this will not surprise very much, as there is no occasion for subsequent reactions. But when hydrogen sulphide and thiosulphate are supplied we know that in principle the products intermediately stored within the cell can be used again as substrates by the bacteria. In the case of hydrogen sulphide, we concluded to the formation of sulphur from the ratio CO<sub>2</sub> : H<sub>2</sub>S, and also from direct observation. In the case of thiosulphate the formation of tetrathionate was concluded to, along two ways of manometric measurement (<sup>(1)</sup> and the present paper). The conclusion may thus be drawn that, under the conditions of our experiments, the conversions:



prevail over reactions in which S, resp. Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub> occur as substrates. Our results indicate that the reactions mentioned above have the tendency to run to completion before other conversions set in in an appreciable degree. Perhaps especially the ph of 6.3, which is generally considered to be „unfavourable” to the metabolic system of these bacteria as a whole (they can not be grown at it), has the property of isolating special reactions and may be expected to suppress especially those conversions which yield acid products like the conversions leading to sulphuric acid.

In <sup>(2)</sup> distinct influences of ph upon the process of photosynthesis in purple sulphur bacteria will be reported. It would undoubtedly be interesting to perform experiments of the type discussed in this paper, also at other values of ph with the same organism.

#### Summary.

In suspensions of the purple sulphur bacterium *Chromatium*, strain D, the ratio between the amount of carbon dioxide and the amounts of various hydrogen donors taken up in photosynthesis, was determined manometrically. All measurements reported were carried out with suspensions in phosphate buffer of ph 6.3, at 29° C.

With the gaseous hydrogen donors H<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>S, the ratios H<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>S : CO<sub>2</sub>,

were studied by introducing limited amounts of these donors in a gas phase containing excess of carbon dioxide; in the case of hydrogen moreover by introducing limited amounts of gaseous carbon dioxide in a gas phase with excess of hydrogen.

In this way the ratio  $H_2 : CO_2$ , and the ratio  $H_2S : CO_2$  were found to be close to 2,0.

The ratio thiosulphate: carbon dioxide was measured also directly, by supplying limited amounts of thiosulphate and measuring the corresponding total assimilation of carbon dioxide. The ratio thiosulphate:  $CO_2$  was found to be in average 8,75, in good agreement with the value previously found from the determination of chemical uptake of carbon dioxide in non-buffered media. This result strongly suggests that the chief primary conversion of thiosulphate is that into tetrathionate.

In all cases the ratio's were practically independent of the amounts supplied, indicating that under the conditions of our experiments the first step of the metabolic conversion of the substrate runs to completion before additional conversions play an appreciable rôle.

The rate of photosynthesis was directly proportional to the concentration of each of the compounds supplied, as far as the concentration was low.

1) J. G. Eymers, E. C. Wassink, *Enzymol.* **2**, 258 (1934). — 2) E. C. Wassink, E. Katz, R. Dorrestein, *Enzymol.*, **10**, 285 (1942). — 3) H. Gaffron, *Bioch. Zs.* **275**, 301 (1935). — 4) S. Wessler, C. S. French, *Jl. of Cell. and Comp. Physiol.* **13**, 327 (1939). — 5) H. Nakamura, *Acta phytochimica* **9**, 189 (1937) (*vide* p. 213). — 6) R. Emerson, L. Green, *Plant Physiol.* **13**, 157 (1938). — 7) C. B. van Niel, *Arch. für Mikrobiol.* **7**, 323 (1936). — 8) C. S. French, *Jl. of gen. Phys.* **20**, 711 (1937). — 9) R. Starkey, *Jl. of gen. Phys.* **18**, 325 (1935).

# On some methodical problems in the study of photosynthesis of unicellular organisms

BY

E. KATZ, E. C. WASSINK AND R. DORRESTEIN

(Biophysical Research Group under the Direction of L. S. Ornstein †, Utrecht,  
and of A. J. Kluyver, Delft)

With 9 figures.

9th Communication on Photosynthesis \*)

(30.VII.41)

## § 1. Introduction.

In this paper we present experimental data concerning a few methodical questions. These data have been collected in the course of an extensive study on the relation between gas exchange and fluorescence in photosynthesis of purple bacteria, to be published shortly (1). Some of the problems to be dealt with, are connected with manometric measurements of photosynthesis in suspensions of small organisms in general, and therefore we have endeavoured to add some theoretical and mathematical considerations.

The gas exchange was measured with simple manometers, according to WARBURG; the objects were suspensions of *Chromatium*, strain D. The method of measurement of fluorescence will be described in our forthcoming paper (1), in which also a full account of methodical details will be given.

The questions which will be discussed in the present paper are:

- 1) The influence of the concentration of the bacterial suspension upon the characteristics of the relation between the rate of photosynthesis and the intensity of incident light (§ 2).
- 2) The influence of the same factor upon the characteristics of the relation between the measured fluorescence intensity and the intensity of incident light (§ 3).
- 3) The influence of slight variations in size of the illuminated bottom areas in vessels used in an intensity range (§ 4).
- 4) A comparison of photosynthesis at various light intensities in sodium light of direct and alternating current lamps (§ 5).

## § 2. The influence of bacterial concentration on the relation between the rate of photosynthesis and the intensity of incident light.

### a. Experimental results and their discussion.

In this section a few experiments are discussed regarding the influence of the concentration of the suspension of unicellular organisms upon the shape of the curve, representing the rate of photosynthesis against the intensity of incident light. They were carried out with *Chromatium*, strain D, but the principles hold just as well for *Chlorella* and other unicellular organisms.

One of the fundamental requirements in studying respiration with the aid of the WARBURG-technique is the establishment of a range of bacterial concentrations in which the gas exchange measured is proportional to the amount of bacteria introduced into the vessels.

\*) 8th Comm.: Enzymol. 10, 257 (1942).

In experiments on photosynthesis, this requirement cannot be fulfilled at low light intensities. For, at a given low intensity of light photosynthesis is proportional to the light-absorption of the suspension, which absorption is not proportional to the number of bacteria present. At high light intensities when light saturation is effected, and thus a dark reaction limits the total velocity, proportionality to the number of bacteria may be found, provided this dark reaction

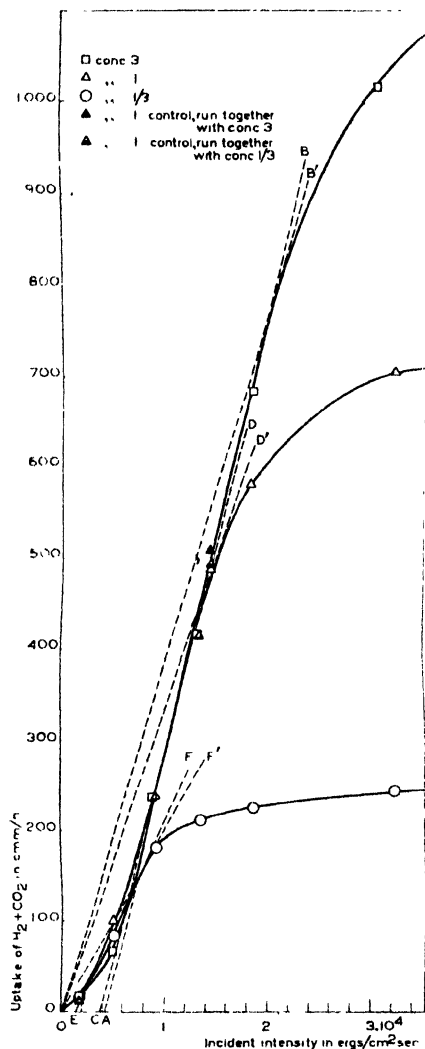


Fig. 1. Effect of bacterial concentration upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5 %,  $\text{H}_2$  30 %, pH 7.6, 29°). Exp. of 19.6.'40.

the origin, would be expected to have slopes differing according to the absorption factors of the suspensions. The quantum efficiency of the light in this intensity range gradually increases with increasing intensity. At a high bacterial concentration the rate of photosynthesis at a given incident intensity in this range may be found lower than at a lower concentration, owing to the fact that the effective mean intensity in a concentrated suspension is lower than in a diluted

is controlled by an enzyme activity, and not by a diffusion factor. This holds when all compounds supplied externally are present in excess, i.e. an increase of their external concentration does not cause an increase in the total reaction velocity. At low light intensities one may only expect an approximate linearity with bacterial concentrations if these concentrations are very low, so that the light is not considerably weakened in passing through the suspension. As a rule, however, this condition will not be fulfilled under the conditions of the experiments, for in so dilute suspensions the readings will become too low to be accurate.

Firstly we shall discuss an experiment with 3 different bacterial concentrations, indicated as 3, 1 and 1/3 respectively, corresponding to 30, 10 and 3.3. TROMMSDORFF-units per ccm. The concentration 1 agrees with the one normally used in our experiments, the absorption of 2 ccm in a white coated conical vessel of the type used in our experiments (cf. e. g. (2), fig. 1) amounted to ca. 60 % in sodium light when the vessel was shaken. Under the same conditions the concentration 3 had an absorption of ca 80%, the concentration 1/3 of ca. 30%.

In fig. 1 the results are reproduced. The curves, representing the rate of photosynthesis against the incident light intensity, have been obtained successively with samples of the same culture. A vessel with concentration 1 was run together with the two other series also, in order to check the activity of the bacteria.

At low light intensities the curves show a part in which the rate of photosynthesis increases with increasing light intensity; this increase is more or less S-shaped, as was also observed by FRENCH<sup>3)</sup> in the case of *Athiorhodaceae*. The meaning of the S-shape is not known; a discussion of some points of view in this connection, will be given elsewhere (1). At low light intensities the three curves run closely together; it is especially noteworthy that curve 3 partially runs below curve 1. This may be considered to be connected with the S-shape, since curves that would start linearly from

one at the same incident intensity. The condition causing a point in the curve 3 to be situated below that at the same *incident* intensity in curve 1 can be derived theoretically as follows.

The rate of gas uptake for a given incident intensity  $I_{inc}$  and a given concentration of bacteria  $c'$  is given by:

$$V'_{exp}(I_{inc}) = \bar{I}'(I_{inc}, c') \times R(\bar{I}') \times c'$$

in which  $V'_{exp}(I_{inc})$  is the rate observed at  $I_{inc}$ ;  $\bar{I}'$  is the mean intensity in the suspension and  $R$  the efficiency of the light at the intensity  $\bar{I}'$ .

For the same incident intensity  $I_{inc}$  and another higher concentration  $c''$  we accordingly have:

$$V''_{exp}(I_{inc}) = \bar{I}''(I_{inc}, c'') \times R(\bar{I}'') \times c''.$$

We have assumed that the function  $R$  is the same in both suspensions, which assumption is not essential, but only simplifying.

The condition sought for, can now be expressed as follows:

$$V''_{exp}(I_{inc}) < V'_{exp}(I_{inc})$$

$$\text{or } \bar{I}''(I_{inc}, c'') \times R(\bar{I}'') \times c'' < \bar{I}'(I_{inc}, c') \times R(\bar{I}') \times c'.$$

For higher concentrations both the effective mean intensity and the efficiency will be lower. The meaning of the condition therefore is, that the decrease in rate due to the decreased effective mean intensity and the decreased efficiency will not be compensated by the increase in rate due to the higher concentration.

This condition can not be fulfilled when comparing dilute suspensions, since in that case the effective mean intensities and hence the efficiencies hardly differ whereas the concentrations may differ considerably. However, for sufficiently concentrated suspensions the condition may be fulfilled. In accordance herewith in fig. 1 the curves related to concentrations 1/3 and 1 do not show the effect mentioned, whereas the curves of concentrations 1 and 3 do.

After the S is „passed” the slope becomes almost proportional to the absorption factor (AB, CD, EF). The quantum efficiency to be derived from this slope therefore is almost the same for each of the three curves (*cf.* Table I, column 3). Three other lines may be traced with about the same characteristics, viz. OB', OD', OF' (*cf.* table I, column 4).

TABLE I.  
Quantum efficiencies Q of the suspensions of fig. 1 in  
molecules of CO<sub>2</sub> per absorbed quantum.

1	2	3	4
con- centration	absorption in shaken, whited vessel	Q derived from steepest slope	Q derived from the tangent from O
1/3	0.29	1 : 10.2	1 : 12.4
1	0.54	1 : 10.4	1 : 13.7
3	0.69	1 : 11.8	1 : 15.7

The next point to be considered is the transition from the light-limiting range to the light saturation range.

The light saturation range is reached at a higher incident intensity the more concentrated the suspensions are.

The rate of photosynthesis at light saturation in the curves 1/3 and 1 differs a factor 3.0, with the curve 3 the region of light saturation is not reached; the rate then may be expected to be again three times higher, viz., ca 2200 cmm p. hour.

The transition point intensity (*cf.* below) was  $1.2 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. for the curve 1/3 and  $2.2 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. for the curve 1. For the curve 3 it may be expected at ca.  $5 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. assuming a value of 2200 cmm/h. for the rate of photosynthesis



under light saturation. The increase of the incident intensity at which saturation is reached with increasing concentration follows directly from the decrease of the mean intensity in the suspension. Therefore the incident intensities at which deviations from the slopes AB, CD, EF occur will be determined by the mean intensities in the suspensions.

The total light fall in a suspension is strongly dependent upon the concentration. If at a given wavelength the total absorption is e.g. 90 %, the light fall is roughly 1 : 0.1; if the absorption is 60 %, it is 1 : 0.4, etc., neglecting reflections from the white wall of the vessel. This leads to the conclusion that the transition range between light limitation and light saturation extends over a larger region of incident intensities, if the suspension is more concentrated. For, assuming that light saturation occurs in a single bacterium as soon as it receives the intensity  $J$ , it is obvious that theoretically the transition range extends between the incident intensities  $J$  and  $10 J$  in the former, and between  $J$  and  $2.5 J$  in the latter example given.

Exact measurements of the mean intensities in a suspension are not easily to be made under experimental conditions. As in a previous study we have used the white sphere for measuring the absorption of the suspensions. An arrangement was applied, which allowed the measurement in both transparent and white coated vessels, whilst they were shaken.

The white coating of the vessels has the advantage of making the light intensity in the suspension higher and more homogeneous; it has the drawback of making the determination of the mean intensities more complicated and introducing an uncertainty into them.

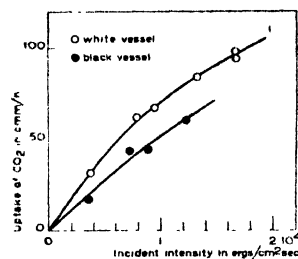


Fig. 2. Effect of white and black coating of manometer vessels upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5 %, thiosulphate 1 %, pH 6.3, 29°). Exp. of 2.3.'38.

We have also tried black-coated vessels in comparison with white ones (cf. fig. 2), but as the considerable decrease of the mean intensity delayed the attainment of light saturation, black vessels were not used further.

Fig. 3 represents an experiment with bacterial concentrations 3 and 1 at various temperatures, which means an extension of the experiment, given in fig. 1.

The general type of the influence of temperature on photosynthesis in purple sulphur bacteria is the same as in organisms containing chlorophyll, viz., in the region of light limitation there is hardly any influence, whereas in the region of light saturation a marked influence is observed. This question will be discussed in greater detail elsewhere (1).

The main series was made with concentration 1, a few vessels with concentration 3 were run simultaneously. With concentration 1 the light-limiting range is fully reached at 11°, 17°, 23° and nearly also at 29°; on the contrary with concentration 3 the light saturation is not yet even fully reached at 11°, still less at 17°, whereas at 23° and 29° the light-limiting range is hardly surpassed.

There is a remarkable similarity between the sequence of the points at  $I = 0.9 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. for concentration 3 and that of the points at  $I = 0.4 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. for concentration 1. This intensity shift for physiologically corresponding points with the bacterial concentration agrees with what one would expect from the theoretical relations derived below.

In this experiment no S-shape was observed; it was as a rule not very pronounced with thiosulphate at pH 6.3. Moreover, in the region of low intensities too few points have been determined to obtain certainty regarding the shape of the curve.

## b. Theoretical considerations.

In earlier discussions regarding the theory of limiting factors the transition between the ranges of influence of two limiting factors was often considered to be an absolutely sharp one. However, already long ago it has been recognized that also in BLACKMAN's concept two factors

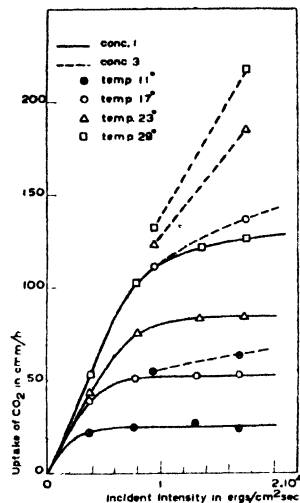


Fig. 3. Effect of bacterial concentration upon the rate of photosynthesis at various temperatures ( $\text{CO}_2$  5 %, thiosulphate 1 %, pH 6.3). Exp. of 11.2.'38.

can influence a process simultaneously (*cf.* ROMELL <sup>4</sup>), VAN DEN HONERT <sup>5</sup>). The range in which two factors become simultaneously experimentally detectable may be called transition range. Evidently the establishment of its observable beginning and end depends on the accuracy of the method used. The point of intersection between the extrapolated part of the curve, related to limitation by a factor and that related to saturation for the same factor will be called: „transition point.” This definition agrees materially with the one given by VAN DEN HONERT who defines the transition point as the point at which two factors exert an equal influence.

VAN DEN HONERT calls attention to the fact that in plots of the rate of photosynthesis against the intensity of incident light, obtained from experiments with cell suspensions, an elongation of the transition range arises due to the fact that the cells partially shade each other. However, in dilute suspensions this will not be of great importance, but the mentioned elongation is nevertheless observed, since it is related to the light fall in the suspension as such, as will be demonstrated below.

The mean intensity  $\bar{I}$  in the suspension will be proportional to the incident intensity  $I_{inc}$ , and we may put  $\bar{I} = \gamma_c I_{inc}$ , in which  $\gamma_c$  depends only on the concentration and on the absorption of the suspension, in a way to be expounded below.

The rigorous computation of the factor  $\gamma_c$  in a shaken white vessel can be carried out as follows: We will put:

$\mu$  = the absorption coefficient per cell for the wavelengths of the incident light,

$c$  = the concentration of the suspension expressed in the number of cells per unit of volume,

$\Omega$  = the volume of the suspension,

$A$  = the area of the bottom of the vessel used,

$h = \frac{\Omega}{A}$  = the average height of the suspension in this vessel,

$a$  = the absorption factor of the suspension, shaken in a white coated vessel,

$b$  = the absorption factor of a non-shaken suspension in a transparent vessel,

$I(w)$  = the light intensity in a volume element  $dw$ .

Then the following relations will hold:

$$\bar{I} \equiv \frac{1}{\Omega} \int I(w) dw$$

to be integrated over all volume elements  $dw$  of the suspension, and:

$$a = \frac{1}{I_{inc} A} \int \mu c I(w) dw$$

to be integrated over all volume elements  $dw$  of the suspension, thus:

$$\bar{I} = I_{inc} \frac{a}{\mu c h} \text{ or } \gamma_c = \frac{a}{\mu c h} \dots \dots \dots (1)$$

and

$$\gamma_c : \gamma_{c'} = a'c'' : a''c' \dots \dots \dots (2)$$

which is a very convenient formula for practical application since it contains only quantities which can easily be determined experimentally.

In (1) the quantity  $\mu h$  can be experimentally obtained from measurements of the absorption of non-shaken dilute suspensions in transparent vessels. For sufficiently low concentrations the decrease of light will be approximately exponential and we have:

$$b(c) = 1 - e^{-\mu c h} \text{ or } \mu h = -\frac{1}{c} \ln \left[ 1 - b(c) \right] \dots \dots \dots (3)$$

The right hand side of equation (3) has to be extrapolated for  $c \rightarrow 0$  to obtain  $\mu h$  correctly. In practice the concentration 1/3 mentioned above, appeared to be already sufficiently dilute to apply equation (3). The validity of an exponential relation for the absorption means that the influence of scattering upon the absorption is negligible. It does not mean, of course, that the influence of the absorption as such upon the gas exchange curves of these suspensions is also negligible (*cf.* fig. 5), because the light fall in the suspension, be it exponential or not, influences  $\bar{I}$ .

In plots of the rate of photosynthesis against the incident intensity, the transition range as measured (the experimental transition range) is due to 3 different effects, *viz.*, 1) introduced by purely experimental complications, *e.g.*, the light fall in the suspensions (methodically imposed transition range), 2) caused by differences between the capacity of the dark system responsible for light saturation in various cells of a suspension and also by variations in individual quantum

efficiencies (statistic transition range), 3) caused by the fact that in each cell a transition range may exist (internal transition range).

The ultimate problem to be solved in this connection is the establishment of the relation between the rate of photosynthesis and the intensity of incident light in a single cell. However, with the methods nowadays at our disposal we are not able to attack this problem, and we must restrict ourselves to the establishment of certain properties of the average cellular assimilation curve.

We define the assimilation rate of the average cell as the assimilation rate per cell in an infinitely dilute suspension. The curve  $V_{av}(J)$ , the „mean cellular” curve, representing the assimilation rate of the average cell,  $V_{av}$ , as a function of the intensity  $J$  it receives, may be extrapolated from measurements in very dilute suspensions. The transition range of this curve represents the combination of the internal and the statistic transition range. Judging from the shape of the curve for rather dilute suspensions (*cf.* curve 1/3, fig. 1) we may well expect that the mean cellular curve will show a rather pronounced BLACKMAN-type.

In concentrated suspensions the imposed transition range has to be taken into consideration. A methodically imposed transition range is connected with the light gradient in the suspension and we will discuss in how far the changes in intensity each cell undergoes due to the fact that the suspensions are shaken, are of importance for the occurrence of an imposed elongation of the transition range in the curve of the average cell.

Firstly we consider the case that the changes in intensity occur rapidly. Then each cell, hence also the average cell, will assimilate according to the mean intensity  $\bar{I}$  in the suspension, and the curve  $V_{exp}(I_{inc})$ , determined for the assimilation rate per cell in an experimental suspension, will be identical with the curve  $V_{av}(J = \bar{I})$ :

$$V_{av}(J = \bar{I}) = V_{exp}(I_{inc}) \dots \dots \dots (4)$$

So every experimentally determined relation between the rate of gas exchange and the incident intensity will have the same shape as the mean cellular assimilation curve, and will differ only by a factor  $\gamma_c$  in the intensity scale. Therefore, with rapid shaking the decrease of light intensity in the suspension does not impose an elongation of the transition range. In this case also intensities above the saturation intensity for continuous illumination may be used efficiently; an analogy is obtained to the conditions prevailing in the wellknown experiments of EMERSON and ARNOLD<sup>6)</sup>.

Two suspensions of different concentration and absorption will yield curves differing by a factor  $\gamma_c/\gamma_c'$  in the intensity scale, which is expressed by the formulae:

$$V'_{exp}(I'_{inc}) = V_{exp}(I_{inc})' \dots \dots \dots (5)$$

with the condition that:

$$\bar{I}' = \bar{I}' \text{ or } I'_{inc} : I_{inc} = \gamma_c' : \gamma_c \dots \dots (5a)$$

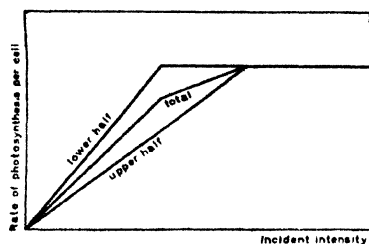


Fig. 4. Scheme representing the elongation of the transition range as imposed by a gradient of light intensity in the suspension.

of the transition range. This may be seen at once from the following elementary consideration.

We assume to have a suspension of cells each of which would yield the same sharply bent monocellular  $V(J)$  curve and we divide the suspension into an upper and a lower half, each with

a homogeneous intensity, but with different intensities in each half, corresponding to the light fall in a real case. Then the assimilation curve observed will be the mean of the assimilation curves of the two halves and, as may be seen in fig. 4, will show a transition range.

The relation between  $V_{av}(J)$  and  $V_{exp}(I_{inc})$  cannot be computed rigorously for the general case of a shaken white coated vessel. A case which can be treated rigorously, namely with exponential light decrease in a layer of suspension of constant height, would be a too crude approximation of our experimental conditions, neither does it fit our data. We have therefore treated the general case in second approximation.

Using symbols with the same meaning as above, we have:

$$V_{exp}(I_{inc}) = \frac{1}{\Omega} \int V_{av}(J = I(w)) dw.$$

Calling  $I - \bar{I} = \Delta I$  we develop  $V_{av}$  in a power series of  $\Delta I$ , and integrate. This yields:

$$V_{exp}(I_{inc}) = V_{av}(\bar{I}) + \overline{\Delta I} \left( \frac{dV_{av}}{dJ} \right)_{\bar{I}} + \frac{(\overline{\Delta I})^2}{2!} \left( \frac{d^2 V_{av}}{dJ^2} \right)_{\bar{I}} + \frac{(\overline{\Delta I})^3}{3!} \left( \frac{d^3 V_{av}}{dJ^3} \right)_{\bar{I}} + \dots \quad (6)$$

Since  $\overline{\Delta I} = 0$  and  $\overline{(\Delta I)^2}$  will be rather small, breaking off after the second order term will yield a quite good approximation. For a suspension of given concentration and absorption all intensities are proportional to  $\bar{I}$ , so:

$$\overline{(\Delta I)^2} = \alpha_c^2 \bar{I}^2 \dots \dots \dots (7)$$

It is clear that  $\alpha_c^2$  depends only on the concentration and the absorption of the suspension. So we have:

$$V_{exp}(I_{inc}) = V_{av}(\bar{I}) + \frac{1}{2} \left( \frac{d^2 V_{av}}{dJ^2} \right)_{\bar{I}} \alpha_c^2 \bar{I}^2 \dots \dots \dots (8)$$

From this formula, which expresses experimental quantities in terms of theoretical ones, the formulae (9)–(10) may be derived to within the same degree of accuracy for small values of  $\alpha$ .

Formula (9) derives a theoretical curve  $V_{av}(J)$  from the experimental one  $V_{exp}(I_{inc})$ :

$$V_{av}(J = \bar{I}) = V_{exp}(I_{inc}) - \frac{1}{2} I_{inc}^2 \left( \frac{d^2 V_{exp}}{d I_{inc}^2} \right)_{I_{inc}} \alpha_c^2 \dots \dots \dots (9)$$

Formulae (10) and (10a) give the relation of two experimental curves belonging to concentrations  $c'$  and  $c''$ :

$$V_{exp}(I'_{inc})_{c'} = V_{exp}(I'_{inc})_{c''} - \frac{1}{2} I_{inc}^2 \left( \frac{d^2 V_{exp}}{d I_{inc}^2} \right)_{I_{inc}} \left( \frac{\alpha_c^2}{1 + \alpha_{c'}} - \frac{\alpha_{c'}^2}{1 + \alpha_{c''}} \right) \dots \dots \dots (10)$$

with the condition, that:

$$\bar{I}_{c'} = \bar{I}_{c''} \text{ or } I'_{inc} : I''_{inc} = \frac{\alpha_{c''} c'}{\alpha_{c'} c''} = \gamma_{c''} : \gamma_{c'} \dots \dots \dots (10a)$$

The formulae (9), (10), (10a) for slow changes differ from the analogous expressions for fast changes (4), (5), (5a) only by a correction term of second order, whose influence, however, cannot be neglected for practical purposes. This term has the tendency to smoothen all curved parts for suspensions with high concentrations, so with high values of  $\overline{(\Delta I)^2}$ .

For larger values of  $\alpha$  one has to take into account higher derivatives of  $V$  with coefficients of  $\alpha$ , but one may still neglect those derivatives with  $\overline{(\Delta I)^3}$  etc.

The formulae thus derived are more complicated than the preceding ones, and, therefore, will be omitted here.

The rigorous computation of the factor  $\alpha_c^2$  (formula (7)) in a shaken white coated vessel is not possible, but this is not necessary, because it is contained only in the correction term of the formulae derived. So inaccuracies in  $\alpha^2$  cause only third order deviations for  $V$ , which have been neglected throughout. Therefore, we will evaluate  $\alpha^2$  for the case of a suspension of homogeneous thickness and exponential decrease of intensity with depth.

In that case, calling  $\mu_{ch} = u$  (cf. formula (3)), and  $\frac{(\overline{\Delta I})^2}{I_{inc}^2} = \varphi$ , we compute:

$$\varphi(u) = \frac{e^{-u}}{u^2} (u \sinh u - 2 \cosh u + 2),$$

which yields after series development:

$$\varphi(u) = \frac{u^2 e^{-u}}{12} \left(1 + \frac{u^2}{15} + \frac{u^4}{560} + \dots\right) \dots \dots \dots (11)$$

We have now the relation between  $(\Delta I)^2$  and  $I_{inc}^2$  for the simplified conditions mentioned. In our experiments the function  $\varphi(u)$  has the tendency to increase owing to the shaking of the vessel, and to decrease owing to the reflection from the white walls of the vessel, so in practice it will be quite well approximated by (11). From (1), (7) and (11) we may derive:

$$\alpha^2 = \frac{(\Delta I)^2}{I^2} = \frac{u^2}{a^2} \varphi(u) = \frac{u^4 e^{-u}}{12a^2} \left(1 + \frac{u^2}{15} + \dots\right) \dots \dots \dots (12)$$

yielding  $\alpha^2$  as a function of  $a$  and of  $u = \mu ch$ .

Whether a change in intensity has to be considered to be slow or fast depends upon its relation to the longest reaction time in the chain of the processes which together constitute photosynthesis.

In this connection we refer to the time of ca. 0.02 sec. determined by EMERSON and ARNOLD as the time required in *Chlorella* at 25° to remove a maximal quantity of „photoproduct”.

In our experiments the vessels were shaken with a velocity of ca. 3 times per second. We may assume that a cell undergoes during one revolution of the vessel not more than a few times the change between the incident and the emerging intensity. Thus, in general the time in which a cell moves from above to below or reverse will be not less than 0.1 sec. Only the time interval between two exposures to high intensity is of importance; this interval will be not less than 0.2 sec., and therefore the changes in intensity a cell undergoes may well be considered to be slow in relation to the characteristic times of the assimilation process.

Various data in literature and our observations on initial changes in fluorescence in *Chlorella* and also in purple sulphur bacteria (4) point to the existence of characteristic times of much longer duration than those considered above. It is obvious that the times involved in the intensity changes which the individual cells undergo owing to the shaking of the vessels, are short in comparison with these ones.

The essential conclusions from the present discussion are:

1) It is possible to derive the relation between the assimilation rate of the average cell and the light intensity it receives from the experimentally determined relation between the rate of photosynthesis and the incident intensity by a transformation which takes account of the light gradient in the suspension. This transformation tends to shorten the transition range between the regions of light limitation and of light saturation.

2) If one wishes to discuss theoretically the shape of the transition range, the curves experimentally obtained should be subjected to the procedure expounded above.

We will now apply the relations derived to the results of the experiments, presented in section a.

The experimental and theoretical data related to the experiment of fig. 1 are collected in Table II and represented in figs 5. and 5a. The absorptions  $a$  and  $b$  of the suspensions were deter-

TABLE II.  
Data concerning the suspensions of fig. 1.

1	2	3	4	5	6	7	8
concentration (relative units)	absorption of the suspension		$-\ln(1-b)$ c	$\frac{a}{\mu ch} = \gamma_c =$ $= \frac{I}{I_{inc}}$	$u = \mu ch$	$\varphi(u)$	$\alpha^2 =$ $= \frac{(\Delta I)^2}{I^2}$
	in a shaken white coated vessel a	in a non-shaken, non-whited vessel b					
c	a	b	*)				
1/3	0.29	0.26	0.93	0.94	0.32	0.0062	0.006
1	0.54	0.58	0.88	0.57	0.95	0.031	0.096
3	0.69	0.78	0.51	0.24	2.85	0.067	1.09

\*) From the figures of column 4 a value for  $\mu h = 0.95$  can be extrapolated, which value has been used in the further columns of this table.

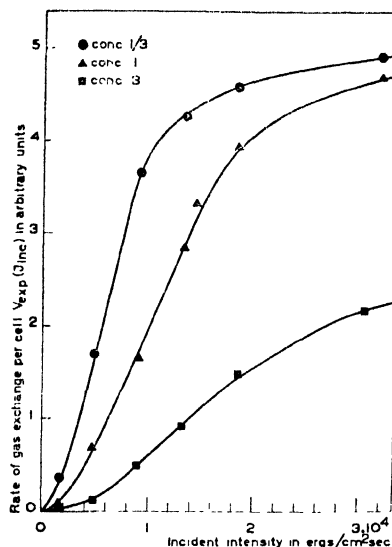


Fig. 5. Rate of gas exchange per cell,  $V_{exp}(I_{inc})$  as a function of the intensity of incident light with various bacterial concentrations. Experimental data from fig. 1.



Fig. 5a. Rate of gas exchange of the average cell,  $V_{av}(J)$  as a function of the light intensity it receives, computed from the data of fig. 5;

—: computed with formula (9) (slow shaking assumed),  
 - - - : computed with formula (4) (fast shaking assumed).

mined with the aid of the white sphere. The curves of fig. 5a for  $V_{av}(J)$  have been derived from the assimilation-intensity curves for every concentration according to formula (9) and also according to formula (4). Especially for concentration 3 the agreement with the latter formula is less satisfactory. We have also checked formula (10) and found that the agreement is very satisfactory. The agreement with formula (5) is much less satisfactory, which is in accordance with the assumption that the changes in intensity due to the shaking are relatively slow for each cell.

The formulae have been checked also using the data of fig. 3. In fig. 6 we have derived curves for the concentration „3” from the curves of concentration „1” with formula (5) and with formula (10)\*. The computed curves fit the experimental points of concentration „3” satisfactorily if formula (10) is applied, but much less if formula (5) is used. Here also this is due to the fact that the rate of intensity changes each cell undergoes is slow in relation to the characteristic times of the process of photosynthesis.

The average cellular curves of photosynthesis against light intensity calculated from our experimental data still show a transition range of some extension (fig. 5a). As has already been pointed out two elements may be responsible for this transition range. In the first place it is conceivable that it has only a statistic character. If the separate cells have sharply bent curves, but individual variations in the transition point intensity

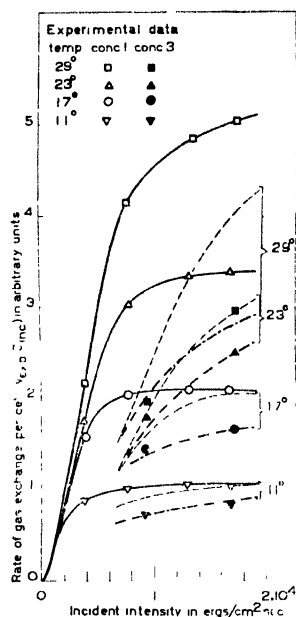


Fig. 6. Rate of gas exchange per cell,  $V_{exp}(I_{inc})$  as a function of the intensity of incident light at various temperatures and with two bacterial concentrations. Experimental data indicated, taken from fig. 3. Theoretical curves for concentration 3 computed from the experimental curves for concentration 1 with formula (10) (— · — · —, slow shaking assumed), and with formula (5) (— — —, fast shaking assumed), showing that the former curve fits best the experimental data for conc. 3.

\* We have employed the same absorption data as for fig. 5 (cf. Table II), because absorption measurements had not been performed on these suspensions.

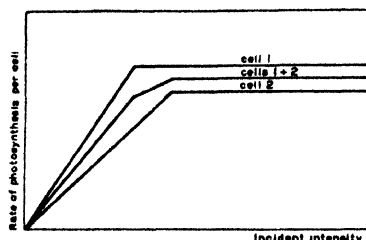


Fig. 7. Scheme representing the elongation of the transition range due to statistic variations in the transition point intensity.

exist (which may be due to different „BLACKMAN” — as well as to different „photic”-capacities) a statistic transition range results for the average cell as is shown in fig. 7. Besides this, however, it is just as well conceivable that also each cell possesses a transition range of its own. This will be the case, if differences in the capacities of the two „limiting factors” exist for different parts of the system within one cell. As was mentioned already we are at present not capable of distinguishing between these two possibilities. Therefore in the equations  $V_{exp}(I_{inc})$  appears expressed in  $V_{av}(J)$  only and not in  $V(J)$  of each cell separately.

### § 3. The influence of bacterial concentration on the relation between fluorescence and the intensity of incident light.

Just as the curves for gas exchange against incident intensity, also the analogous curves for fluorescence must be expected to be influenced by the concentration of the bacterial suspension. However, the total effect is different. Firstly, for very thick suspensions — absorption factor near to 1 — the fluorescence-irradiation curve will scarcely be affected by further increase of concentration, since, for any incident intensity the fluorescence measured will be almost independent of concentration. The gas exchange on the contrary will continue to increase considerably with increasing concentration, provided the incident intensity is sufficiently high. The rate of gas exchange will even become proportional to the bacterial concentration as long as the incident intensity is so high that each cell assimilates at its BLACKMAN-rate.

Moreover, a second difference between the behaviour of gas exchange and of fluorescence exists. Whereas in the case of gas exchange the decrease of the light intensity in the suspension is the only complicating factor, the amount of fluorescence measured is also affected by the absorption of the fluorescence light in the suspension. It will be seen from the following considerations, that the influence of the bacterial concentration upon the fluorescence-irradiation curves is appreciably smaller than that upon the corresponding curves for gas-exchange.

In our experiments fluorescence was measured after the shaking of the suspension had been stopped (*cf.* (1)). Accordingly the changes in intensity of the light which each cell undergoes, will be slow in relation to the characteristic velocities of the processes which determine fluorescence. For this reason the intensity of the fluorescence light emitted by each cell will correspond to the intensity of the light it receives at any moment (*cf.* § 2).

In measurements of gas exchange all parts of a suspension contribute to the total gas exchange at rates corresponding to the local light intensities, provided the shaking is slow in relation to the reaction velocities involved (*cf.* § 2). In fluorescence measurements, applying bottom-illumination, the lower layers of the suspension contribute excessively to the fluorescence light, emerging through the bottom of the vessel, since the fraction contributed by the upper layers is already small owing to the decrease of the irradiation intensity in the suspension and is again decreased owing to the absorption of the fluorescence light.

In fluorescence-irradiation curves of our bacteria, *viz.*, *Chromatium*, strain D, two more or less linear parts can be distinguished, connected by a transition range, and allowing to determine a transition point (for further details *cf.* § 2 and especially (1)). On determining the fluorescence of suspensions of the mentioned bacteria in relation to the incident intensity (temp. 29°, pH 6.8, with thiosulphate and  $CO_2$  present in excess) at different bacterial concentrations (1/8, 1, 3, *cf.* Table II) we obtained curves which — within the limits of experimental error — coincided after introducing a suitable factor in the direction of the vertical (fluorescence) axis. This means a marked contrast to the situation for the gas exchange curve in which the transition point intensity shifts considerably towards higher intensities with increasing concentration (fig. 1), and never reaches a limit.

The influence of self-absorption on the shape of the fluorescence-irradiation curve can in principle be computed from the absorption and fluorescence spectra of the bacteria. Since, however, the latter spectrum is not yet known sufficiently accurately under the conditions of our experiments, we cannot follow this way. However an approximate estimation of the influence of self absorption may be obtained by comparing the absorption factor and the intensity of fluorescence for a given incident intensity, at different concentrations.

The energy absorbed per sec. is given by:

$$I_{\text{inc}} A a(c),$$

in which  $A$  is the bottom area of the vessel, and  $a$  the absorption factor as a function of the bacterial concentration  $c$ . Therefore, if  $I_{\text{inc}}$  is low enough to guarantee proportionality between fluorescence and incident intensity for each cell, the amount of fluorescence that would be observed in the absence of self absorption, can be represented by:

$$\eta I_{\text{inc}} A a(c),$$

in which  $\eta$  is a coefficient containing the yield of fluorescence, but being independent of  $I_{\text{inc}}$  and of  $c$ . The amount of fluorescence, actually observed, is then given by

$$F_{\text{exp}} = g(c) \eta I_{\text{inc}} A a(c) \dots \dots \dots (13).$$

in which  $g(c)$  is the factor, accounting for the influence of self absorption; the upper limit of  $g$  is unity for concentration zero.

We determined the function  $g(c)$  by measuring  $F_{\text{exp}}$  and  $a$  for various bacterial concentrations; since  $\eta$ ,  $I_{\text{inc}}$  and  $A$  were kept constant, the relative course of  $g(c)$  is obtained by dividing  $F_{\text{exp}}$  by  $a$ . Taking into account that  $g(0) = 1$ ,  $g$  now can be computed for each value of  $c$ . For high concentrations both  $a$  and  $F_{\text{exp}}$  and therefore also  $g$  approach a limit; we found the limit for  $g$  to be about 0.5.

Theoretically the influence of self-absorption can be computed under the simplified assumption of an exponential decrease both for the incident light and for fluorescence light as it passes through the suspension. Introducing  $\mu_1$ , and  $\mu_2$  as the respective absorption coefficients, the final value for

$g$  at high concentrations is given by  $\frac{\mu_1}{\mu_1 + \mu_2}$ . Thus with  $g(\infty) = 0.5$ ,  $\mu_1 \approx \mu_2$ , and the fluorescence light appears to be about as strongly absorbed as the incident light.

Assuming exponential decrease of light intensity, fluorescence-irradiation curves for any bacterial concentration can be computed from a theoretical curve for one cell. The latter curve has been supposed to consist of two linear parts, intersecting at the transition point intensity, without a transition range. Putting  $\mu_2 = \mu_1$ , the curves thus computed for concentrations varying from 1/3 to  $\infty$ , show indeed only insignificant shifts of the transition point intensity. These shifts amounted to about 10%, whereas also variations in the relative shape of the curves were not very apparent. Thus the result obtained theoretically under the mentioned simplifying assumptions, essentially agrees with the situation actually found in the experiments, which indicates that indeed the self-absorption of fluorescence light is the chief cause for the at first sight remarkable independence of the fluorescence-transition-point intensity from the bacterial concentration.

When comparing curves for gas exchange and for fluorescence in suspensions that are not very dilute, the dissimilar influence of concentration must be taken into account. This obtains already for concentration 1, normally used in our experiments as a suitable concentration for the measurement of gas exchange. The absorption is still far from unity, nevertheless, owing to the influence of self-absorption, fluorescence was already near to its maximum. Therefore, this concentration, being as such not very high, must be denoted as high with respect to the measurement of fluorescence. Only for the lowest concentration, so far used in our experiments, viz., 1/3, the absorption of fluorescence light is sufficiently low to make corrections unnecessary.

We have developed formulae that are suited to convert experimental fluorescence-irradiation curves  $F_{\text{exp}}(I_{\text{inc}})$  into the curve for the average cell  $F_{\text{av}}(J)$ . Along the same lines as was exposed for gas exchange in § 2, the transformation is attained with the aid of correction terms containing differential quotients, in this case of  $F_{\text{exp}}$  to  $I_{\text{inc}}$ . The formulae, however, will not be presented here for the following reasons:

1. Since the self-absorption of the fluorescence light leads to extra terms, the correction is more complicated than in the case of gas exchange, which renders the approximation less certain.

2. The concave shape of the fluorescence-irradiation curves causes that the corrections required by the formulae act in opposite directions, rendering the total change very small. This is in good agreement with the experimental results, but it makes an experimental check of the formulae practically impossible.

It can however be noticed that for concentration 1/3 all correction terms are small, just as in the case of gas exchange. For concentration 1 the corrections as such are not negligible but the total change in the shape of the curve is small (*cf.* above). For concentration 3 the correction terms in the formulae become too large to allow the use of the formulae at all.



#### § 4. The effect of slight variations in bottom area of the vessels upon the rate of photosynthesis.

In this section we will discuss the influence of slight variations in bottom area of manometer vessels, used in the same serial experiment on photosynthesis, in an equipment with the general characteristics of ours.

We used a tube-shaped sodium lamp of ca. 60 cm length, the light of which entered horizontally into the thermostate, it was reflected upwards by a mirror placed in the thermostate at an angle of 45°, and entered the vessels through the bottoms. No lenses were present in the system. The light was measured with a standardized thermopile, the sensitive surface of which was placed as exactly as possible at the place of the bottom of each vessel successively.

A given volume of bacterial suspension, illuminated with the same incident light intensity in various vessels in general will not show exactly the same rate of photosynthesis as far as light enters as a limiting factor in the process. This is due to variations in bottom area of the various vessels. The vessel with the largest area will have a smaller light fall, and thus a higher mean intensity, and will therefore give rise to a higher total rate of photosynthesis.

Theoretically the best way of working would be to fill each vessel to the same height, so with an amount of suspension proportional to its area, and to divide then the observed gas exchange by the bottom area. Then each vessel would have the same light fall, and the values thus obtained would agree among each other. However such a procedure is unusual and also inconvenient, so that normally each vessel will be filled with the same amount of suspension, hence to a somewhat different height.

Therefore, we will compute the relation between gas exchange and bottom area in order to be able to correct for the variations in bottom area.

The same notation as in § 2 will be used; the absorption factors  $a$  and  $b$  and the average intensity  $\bar{I}$  now are considered as functions of the bottom area  $A$ , whereas the incident intensity  $I_{inc}$  and the volume  $\Omega$  of the suspension are thought to be fixed.

Formula (8) for the assimilation per cell shows that the influence of the bottom area upon  $V_{exp}$  may be described as a change of  $\bar{I}$  only, whereas changes in  $\alpha$  have no influence, if we only go to the first order of approximation. Furthermore, in this section we will approximate  $a(A)$  by

$$b(A) = 1 - e^{-\frac{\mu c \Omega}{A}}, \text{ cf. formula (3). Then, according to (1):}$$

$$\bar{I}(A) = I_{inc} \frac{b(A) \cdot A}{\mu c \Omega} \dots \dots \dots (14)$$

From (14) and (3) we obtain for the mean intensity in a vessel with a bottom area  $A + \Delta A$ :

$$\bar{I}(A + \Delta A) = \bar{I}(A) \left[ 1 + \frac{\Delta A}{A} \left\{ 1 + \frac{1-b}{b} \ln(1-b) \right\} \right] \dots \dots \dots (15)$$

For  $b \rightarrow 0$  (very dilute suspensions) formula (15) becomes:

$$\bar{I}(A + \Delta A) = \bar{I}(A) \left[ 1 + \frac{\Delta A}{A} \cdot \frac{b}{2} \right] \rightarrow \bar{I}(A) \dots \dots \dots (15a)$$

For  $b \rightarrow 1$  (very concentrated suspensions) formula (15) becomes:

$$\bar{I}(A + \Delta A) = \bar{I}(A) \left[ 1 + \frac{\Delta A}{A} \right] \dots \dots \dots (15b)$$

Formula (15b) expresses, that the intensity should be corrected for the full difference in bottom area with concentrated suspensions. In other words, results of measurements of gas exchange with light intensity as a variable should be plotted against  $I_{inc} \left( \frac{A + \Delta A}{A} \right)$ .

Formula (15a) shows that for very dilute suspensions such measurements should be plotted against  $I_{inc}$  without any correction for inequalities of bottom areas.

The general formula (15) yields the amount of correction for intermediate concentrations, which as a rule are used in our experiments. The rate of gas exchange measured at a given incident intensity in a vessel with bottom area  $A + \Delta A$  would also be obtained in a vessel with bottom area  $A$  at an incident intensity which is  $\left[ 1 + \frac{\Delta A}{A} \left\{ 1 + \frac{1-b}{b} \ln(1-b) \right\} \right]$  times as high. In this way measure-

ments, made in vessels with slightly different bottom areas can be made comparable. In Table III numerical values of the factor  $\delta = \left\{ 1 + \frac{1-b}{b} \ln(1-b) \right\}$  as a function of  $b$  are given.

TABLE III.  
Values of  $\delta$  for various values of  $b$  (see text).

$b$	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,95	1,0
$\delta$	0	0,05	0,11	0,17	0,23	0,30	0,39	0,49	0,60	0,75	0,84	1,0

Corrections in this sense have been applied to the assimilation data presented in this paper, and in (1); with our vessels they amounted to 4% at most.

An analogous question presents itself in connection with the determination of the absorption of the suspension in the white sphere. The vessel used for the measurement will again have a bottom area somewhat different at least from part of the manometer vessels used in the experiments. Let the bottom area of an assimilation vessel be  $A$  and the bottom area of the vessel for absorption measurements be  $A + \Delta A$ , then the measured absorption  $b(A + \Delta A)$  and the actual absorption  $b(A)$  will be related by:

$$\begin{aligned}
 b(A + \Delta A) &= b(A) + \frac{db(A)}{dA} \Delta A + \dots \\
 &= b(A) \left[ 1 + \frac{\Delta A}{A} \left\{ \frac{1-b}{b} \ln(1-b) \right\} \right] \dots \dots \dots (16) \\
 &= b(A) \left[ 1 + \frac{\Delta A}{A} (\delta - 1) \right]
 \end{aligned}$$

The same relation will hold in first approximation for the absorption measured during shaking,  $a(A)$ .

For a determination of the quantum efficiency  $Q$  we have to divide the gas exchange  $V$  by the absorbed energy expressed in quanta:

$$Q = \frac{V h \nu}{I_{inc} \cdot A \cdot a(A)} = \frac{V h \nu \left\{ 1 + \frac{\Delta A}{A} (\delta - 1) \right\}}{I_{inc} \cdot A \cdot a(A + \Delta A)} \dots \dots \dots (17)$$

This formula shows that a correction analogous to the one required for relative rate-measurements against incident intensity has to be applied, which also was done in the experiments presented here.

In our experiments the WARBURG vessels had an average bottom area of 660 mm<sup>2</sup> whereas the vessel in which the absorption was measured, had an area of 750 mm<sup>2</sup>, so that for the normal concentration, absorbing about 60%, a correction of the absorption of + 5% of its value had to be applied.

## § 5. Photosynthesis in light of direct and alternating current sodium lamps.

### a. Experimental.

In a previous paper (7) we have already reported some observations in which photosynthesis upon a.c. sodium light (50 cycles/sec.) was compared with the yield upon d.c. sodium light. The d.c. sodium lamp at that time at our disposal could provide only rather low intensities. The result obtained was that no difference was apparent between the rate of photosynthesis in both types of sodium light. Furtheron only a.c. light was used, because herefor lamps with much higher output of light were obtainable. However, we still felt somewhat anxious regarding a possible influence of the alternation, especially in the intensity range between light limitation and light saturation. We therefore were very glad to be able to make comparisons also between both types of sodium light in the whole range of intensities used. This was possible with the aid of a strong d.c. sodium lamp of ca. 90 cm. length, kindly manufactured for us by the Physical

Laboratory of PHILIPS N.V., Eindhoven. We have made comparisons with hydrogen as donor at pH 6.8, both with bacteria submitted to a starvation procedure (*cf.* (1)) and with bacteria directly from the culture medium. Each time two cultures were prepared in the same way.

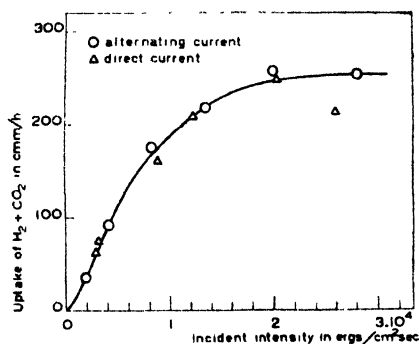


Fig. 8. Effect of direct and alternating current sodium light upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5 %,  $\text{H}_2$  15 %, pH 6.8, 29°). Frequency of intermittency 100 cycles p. sec. Exp. of 28.11.'39.

EMERSON and LEWIS (8) found the yield of *Chlorella*-photosynthesis at low light intensities to be the same with a sodium lamp operated on alternating or on direct current.

### b. Theoretical.

We may ask for the conditions which cause the action of intermittent illumination not to be distinguishable from that of continuous irradiation with the same average intensity.

Two extreme cases are easily discussible, namely a) very low frequency of intermittency and b) very high frequency of intermittency.

In the first case, if the frequency of intermittency is low, so if the successive light and dark periods are sufficiently long, their effect will simply be the sum of the effects of the light periods and will be independent of the frequency.

In the second case, if the frequency of intermittency is sufficiently high, the total effect will equal that obtained by continuous irradiation with the same average intensity. This conclusion is evident when we take into consideration the fact that absorption itself is a discrete, i.e., intermittent effect. With respect to the absorbing pigment system a certain continuous intensity is equivalent with a certain probability distribution for the lengths of the intervals between successive acts of absorption in one unit of action. It can be proved by simple calculations that if the period of intermittency is short compared with the average interval between successive acts of absorption in one system or unit, this system will not be able to distinguish between continuous and intermittent irradiation, in other words the probability distribution of the time intervals between two impinging quanta upon the system is equal for both cases.

Calling the rate of gas exchange at any moment as a function of the incident intensity  $V(\text{Inc})$ , we have \*) for low frequencies:

$$V_{\text{exp}} = \frac{1}{T} \int_0^T V(I(t)) dt = \overline{V(I)} \quad \dots \dots \dots (18)$$

in which  $T$  is the time for one cycle of intermittency, whereas for high frequencies we have:

$$V_{\text{exp}} = V(\bar{I}) \quad \dots \dots \dots (19)$$

As far as  $V$  is proportional to  $I$ , i.e., when  $V = c I$ , there does not exist any intermittency effect, independent of the way in which  $I$  varies with  $t$ .

\*) In the formulae presented in this section the index „inc” has further been omitted, as all intensities referred to are incident intensities.

According to (18) we then have:

$$\overline{V(I)} = \frac{1}{T} \int_0^T cI(t) dt = c\overline{I} = V(\overline{I}) \quad \dots \dots \dots (20)$$

The rate of gas exchange then is equal for low and for high frequency of intermittency and hence in the intermediate range of frequencies also the same rate will be observed.

Approximately, the same will hold, if during almost the whole cycle  $I$  varies within a range of intensities for which  $V$  is a linear function of  $I$ , or within a range for which  $V$  is independent of  $I$ . For, substituting  $V = c_1 I + c_2$  in (18) yields.

$$\overline{V(I)} \approx \frac{1}{T} \int_0^T c_1 I(t) dt + \frac{1}{T} \int_0^T c_2 dt = c_1 \overline{I} + c_2 = V(\overline{I}) \quad \dots \dots \dots (21)$$

Thus, an intermittency effect is practically excluded in the region of light limitation \*) and in the BLACKMAN region, at least as far as in the latter region  $V$  is since long practically independent of  $I$  \*\*). Consequently, a possible effect of intermittency is restricted to the transition range and the first part of the saturation range.

There indeed the gas exchange at low frequency  $\overline{V(I)}$  and the one at high frequency  $V(\overline{I})$  will in general differ and we may expect that  $\overline{V(I)} < V(\overline{I})$  since  $\overline{V(I)} = V(\overline{I}) + \frac{1}{2} (\Delta I)^2 \left( \frac{d^2 V}{dI^2} \right) \overline{I} + \dots$  and  $\left( \frac{d^2 V}{dI^2} \right) < 0$ .

At a constant average intensity in the transition range the extreme parts of a plot of  $V$  against the frequency of intermittency, viz., the constant values of  $V$  at very low and at very high frequencies can be drawn schematically, according to the discussion presented above. The region of medium frequencies is uncertain, but will have to follow some transitory curve from the low to the high value of  $V$  (fig. 9),

The effect of intermittency enters the formulae only as a second order effect, which, however, may assume non negligible values. For the sodium vapour lamp operated at an alternating tension of 50 cycles/sec. we have computed this effect from the known light-intensity-time relation in such lamps.

The maximum difference that can be expected in this case between the rates of photosynthesis in continuous and in intermittent light amounts to 18 %.

Since a difference of this magnitude certainly would have been observed, the conclusion that no effect of the intermittency of the light was present in our experiments, appears to be justified.

It also ensues that the transitory frequency range lies below 100 cycles per sec.

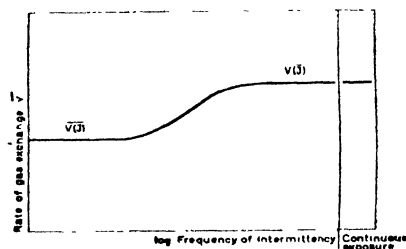


Fig. 9. Scheme representing the effect of the frequency of intermittency upon the rate of photosynthesis in comparison with the rate under continuous illumination with the same average intensity.

## Summary.

In this paper the influence of some methodical factors, active in experiments on photosynthesis with suspensions of unicellular organisms, has been discussed. In the present study suspensions of *Chromatium*, strain D, were used.

\*) Large deviations occur if intermittency of light is produced e.g. by a sector wheel, or in general if  $I = 0$  during an appreciable part of a cycle. In the case of a sodium lamp, however,  $I$  is zero only for one moment and the approximation given above is allowed.

\*\*) In order to avoid misunderstanding we emphasize that  $V$  is expressed as rate per unit of time during the whole experiment, and not per unit of time during the period of illumination only, as in the well-known experiments on intermittent light of WARBURG and of EMERSON and ARNOLD. Thus, in our case, the rate in continuous light is the highest one observable throughout.

In § 2 the influence of the concentration of the bacterial suspension upon the relation between the rate of gas exchange and the intensity of the incident light has been dealt with. It is discussed in how far the increase of the light gradient in the suspension with increasing concentration smoothens the experimental curves of gas exchange against incident intensity. General formulae are developed for the magnitude of this effect in shaken, white-coated conical vessels. Checks showed that the calculated corrections were in good agreement with experiments.

In § 3 the effect of the bacterial concentration in fluorescence measurements has been discussed, and the influence of self-absorption of the fluorescence light has been considered.

In § 4 slight variations in bottom area of manometer vessels, used in the same series, which influence the measured rate of photosynthesis at the same incident intensity, have been dealt with. The way in which their influence has to be corrected, is discussed. The magnitude of these corrections depends upon the bacterial concentration.

In § 5 the rate of photosynthesis upon light from direct and alternating current sodium lamps has been compared and discussed. For 100 cycles of light per sec. (50 tension cycles per sec.) no difference in photosynthesis was observed. It is shown theoretically that an intermittency effect may only be expected for intensities above the range of light limitation and at frequencies below a certain value. The computed magnitude of the effect to be expected under the conditions of our experiments is such, that it certainly would have been detected if it had been present, so that the transitory frequency value lies below 100 cycles per sec.

1) E. C. Wassink, E. Katz, R. Dorrestein, *Enzymol.* **10**, 285 (1942). — 2) E. C. Wassink, E. Katz, *ibid.* **6**, 145 (1939). — 3) C. S. French, *Jl. of gen. Physiol.* **20**, 711 (1937). — 4) L. G. Romell, *Jahrb. wiss. Bot.* **65**, 739 (1926). — 5) T. H. van den Honert, *Rec. trav. bot. Néerl.* **27**, 149 (1930). — 6) R. Emerson, W. Arnold, *Jl. of gen. Physiol.* **16**, 191 (1933). — 7) J. G. Eymers, E. C. Wassink, *Enzymol.* **2**, 258 (1938). — 8) R. Emerson, C. M. Lewis, *Amer. Journ. of Bot.* **26**, 808 (1939).

---

# On photosynthesis and fluorescence of bacterio-chlorophyll in Thiorhodaceae

BY

E. C. WASSINK, E. KATZ AND R. DORRESTEIN \*)

(Biophysical Research Group under the Direction of L. S. Ornstein†, Utrecht,  
and of A. J. Kluyver, Delft)

With 89 figures

10th Communication on Photosynthesis \*\*).

(6.VIII.41)

## Chapter I.

### Introduction.

#### § 1. General remarks.

In our studies on the relation of photosynthesis and chlorophyll fluorescence in suspensions of *Chlorella*, we have at first restricted ourselves to measurements in the stationary state of illumination and photosynthesis (1, 2). We intend to extend this work in several directions. On the one hand our programme includes a study of the mentioned relation in the induction phase after the start of an illumination. We have already presented data regarding the fluorescence in this phase (3), but correlative data regarding the gas exchange were not yet obtained. On the other hand it was desirable to extend the observations to organisms with different photosynthetic systems. As we already had some experience with purple sulphur bacteria (4), it was indicated to give attention to this group firstly. Also other arguments spoke in favour hereof. In the first place there is a growing tendency to accept the mechanism of photosynthesis in green plant cells and that in purple bacteria to be closely related, namely in so far as both are often assumed to start with the splitting of HOH in some way. In the second place, there is the outstanding fact of the indispensability of so called hydrogen donors in photosynthesis of purple bacteria, ordinary green cells having no need for such substances. In later years many investigators have, contrary to the original ideas, advanced especially by KLUYVER and VAN NIEL, put forward evidence which they consider to be in favour of the view that these substances play only a very secondary rôle. From data in literature and from the general preliminary concept of photosynthesis developed elsewhere (2), moreover vaguely inspired by certain data concerning the absorption spectra of purple bacteria (5), we felt inclined to ascribe again a more direct importance to the substances in question, and in this connection we have suggested that they might play an essential rôle in the „photic” part of the process (5). Also for this reason a study of the relation between fluorescence of bacterio-chlorophyll and photosynthesis in purple bacteria seemed promising.

On surveying the literature on purple bacteria it can be remarked that the knowledge concerning their metabolism is rather extensive in some directions and rather scanty in others. Considerable evidence exists, especially due to the work of VAN NIEL (6, 7, 8), of GAFFRON (9, 10), and of MÜLLER (11), concerning the chemistry of various reactions involved. On the contrary no much stress has been laid so far upon the study of the kinetics of the metabolic reactions. This may for the greater part be due to the fact that in applying a technique, fit for velocity measurements, so especially a manometric technique, serious errors may result, unless the gas

\*) The authors wish to thank Miss L. VAN LUMMEL for experimental assistance.

\*\*) 9th Comm.: *Enzymol.* 10, 269 (1942).

exchanges due to chemical conversions occurring in the medium are rigorously controlled. This may be the reason that few quantitative data exist concerning the response of the velocity of photosynthesis to changes in light intensity and in temperature and to addition of inhibiting substances.

Therefore the data concerning the influence of various factors on the gas exchange as presented in this paper, may have a certain interest as such, and hence they have been treated in greater detail than was deemed necessary in the case of *Chlorella* (1). But as a correlative study of gas exchange and fluorescence proved to lead to a much more profound understanding of the characteristics of the process of photosynthesis in the bacteria, we have discussed the measurements on gas exchange together with those on fluorescence.

In order to facilitate the survey, we will briefly expound the questions to be discussed in this paper.

Since we feel that the significance of fluorescence studies in photosynthesis has been subject to some misunderstanding in recent literature (12), we thought it useful to give a somewhat detailed outline of what we consider to be the importance of a correlative study of the rate of photosynthesis and of the intensity of fluorescence (§ 2). It may be remarked that the chief points had already been indicated in our papers on *Chlorella*.

In Chapter II the experimental methods of the measurements of gas exchange and fluorescence are described. The same strain of bacteria, viz., *Chromatium*, strain D, also used in the earlier investigation (4), was used throughout this study.

We start the discussion of the experimental data with a description of the general character of the relation between the incident intensity and the rate of photosynthesis, and of the general character of the relation between the incident intensity and the intensity of fluorescence (Chapter III).

In Chapter IV we discuss the influence of the following agents: quality and quantity of hydrogen donors, temperature, and pH, on gas exchange and fluorescence. The influence of these various agents proved to bring about effects of the same type.

An effect different with respect to fluorescence is exerted by variations of the CO<sub>2</sub>-tension, and by various inhibitors as cyanide, hydroxyl amine, azide and urethane (Chapter V).

Additionally we present some preliminary observations on the fluorescence of pigment-protein extracts, and on initial changes of fluorescence after the start of illumination, and some other more or less incidental observations (Chapter VI).

Finally a general discussion is given (Chapter VII).

The concept of photosynthesis as put forward in our papers on *Chlorella* could readily be extended in such a way as to fit the experimental results described in this paper. Also the mathematical description given earlier (2) could be extended to cover the mechanism of photosynthesis obtaining in purple sulphur bacteria. These latter considerations will be presented in a separate paper (13).

## § 2. On the measurement of fluorescence of the photoactive pigments in the living cells as a tool in the study of photosynthesis.

In view of a better understanding of the significance of fluorescence phenomena in purple sulphur bacteria we endeavour to elucidate in detail what conclusions can be drawn from fluorescence observations and upon what principles these conclusions are founded.

Hereto we will consider successively the changes which light energy undergoes after it has entered a living cell and before it is ultimately involved in the process of photosynthesis.

### 1. Absorption of light.

According to EINSTEIN absorption is considered to be a quantic process, which means that the light energy is absorbed by multiples of a unit quantum  $E$ , the latter depending only on the frequency  $\nu$  of the light by the relation  $E = h\nu$ ,  $h$  being PLANCK's constant. Moreover, the quantic nature of light absorption and emission was brought into connection with transitions in atoms or molecules between stationary states, the energies of which differ by discrete or quantic amounts (BOHR). It is generally accepted nowadays, that this description is adequate for all absorption and emission phenomena.

In our case a quantum of light will be absorbed by a chlorophyll-molecule and will cause one

of its electrons to jump from its normal or ground state to some excited state, i.e. a state of higher energy, the increase in energy amounting to  $E = h\nu$ . It follows that absorption of light of different frequencies will give rise to different excited states of the chlorophyll-molecules.

The question which one of the many electrons of chlorophyll is excited has been discussed during the last years in several ways. Though it is not of essential importance for our discussion, we may mention that the inner ring skeleton with conjugated double bonds of the chlorophyll molecule is considered as chromophoric and that an electron, moving in this ring, is more easily excitable than other electrons of the molecule, thus being excitable by visible light.

## 2. Annihilation of excitation.

When an electron in chlorophyll has been excited, we may ask for the further fate of the excitation energy.

Following P. PRINGSHEIM a.o. <sup>14</sup>) three possibilities are to be considered. 1) The excited electron may fall back spontaneously to a lower state with the emission of a fluorescence quantum. 2) The electron may fall back to a lower state during an interaction (collision) with another molecule, giving off energy of excitation as kinetic energy to its collision partner. 3) The electron may fall back to a lower state during an interaction with another molecule, giving off energy of excitation as potential energy to its collision partner, which thus becomes excited. If this potential energy is not equal to the loss in excitation energy of the chlorophyll molecule, the difference is made up for by giving off kinetic energy to the colliding particles or by accepting kinetic energy from them.

These processes will ultimately make the molecule, excited by the absorption of light, return to the ground state, eventually in a number of steps, when several of the mentioned processes take place successively.

The number of processes per unit of time involved in each of these ways of annihilation of excitation energy, and hence also their sum, is directly proportional to the number of excited molecules present \*). Which one of the processes will prevail in a given case depends on their relative probabilities.

The probability for the first process may be considered as a constant of the excited molecule, this probability being insensitive to external factors. The probability for the second process is larger, the smaller the energy is, that is given to the partner in the collision. Hence this process will take place especially if the electron can fall down a series of narrowly spaced energy levels. The probability of the third process is the larger, the more the excitation energy equals the potential energy that the accepting molecule is able to receive, or the smaller the kinetic energy is, that is produced or annihilated during the collision (energy resonance). The sum of these three probabilities determines the actual value of the concentration of excited molecules stationarily present at a given intensity of incident light.

In the case of chlorophyll in living cells only a small fraction of the absorbed quanta of the order of 0,1% is reemitted as fluorescence light, a large fraction is used for CO<sub>2</sub>-assimilation and the remainder is transformed into heat (kinetic energy).

As was already remarked, the probability of emitting fluorescence is determined by the properties of the chlorophyll molecule as such, whereas the probabilities for the two other processes are determined by the properties of the chlorophyll on the one hand and by those of the energy accepting system on the other hand, and are thus susceptible to variations in quality and concentration of the latter.

Anyhow the intensity of fluorescence, that is the number of quanta emitted per unit of time, remains under all conditions a direct measure for the number of excited chlorophyll molecules present, this intensity being always equal to that number multiplied by the probability factor for fluorescence. Therefore it provides also a direct measure for the total amount of energy transferred from the excited chlorophyll along the two other ways to other systems. The relation is markedly simplified by the fact that only a negligible fraction of the energy is dissipated as fluorescence, so that the latter may be considered as inversely proportional to the amount of energy dissipated along the two other ways.

Concerning the second way of annihilation of excitation the following remarks may be made.

\*) The case that two excited molecules should react mutually, is not considered here.



Under conditions of light limitation the yields of both photosynthesis <sup>(15)</sup> and of fluorescence <sup>(16)</sup> upon incident light of different wavelengths are determined solely by the number of quanta absorbed by the chlorophyll. This probably means that high excitation is brought down to low one by the way of annihilation under discussion, which is obviously made possible by a continuous distribution of energy levels between the higher states of excitation and the lowest one. It also means that the lowest excitation is practically not annihilated by such a process, which is in accordance with the high quantum efficiency, realizable in photosynthesis.

Concerning the third way of annihilation of excitation we may remark, that it becomes probable from the preceding considerations that the transfer of energy to molecules which accept the energy as potential energy and use this energy for chemical reactions takes place only from the lowest excitation level, as has already been remarked by WARBURG <sup>(17)</sup>.

We will now deal in some more detail with the possible experimental relations between chlorophyll fluorescence and intensity of incident light.

In the first place we will consider the case that the intensity of fluorescence is proportional to the intensity of irradiation over the whole range of intensities studied. This means that the stationary concentration of the excited chlorophyll too is proportional to the intensity of irradiation. Then the rate of annihilation of the excited state of the chlorophyll is also proportional to the incident intensity only, and therefore the sum of the annihilation probabilities is constant. This again implies that the energy transfer from the excited molecule is not limited by the transfer action as such. This requires that the acceptors are present in abundance, or in other words that acceptor molecules that have reacted are replaced by new ones in a time that is very short in relation to the intervals between successive transfer actions. Assuming that different acceptors are present at the transfer system, these together determine the slope of the straight fluorescence-irradiation curve. In general this slope can be changed only by varying the energy acceptors, thus by replacing the acceptors present partly by other ones with different transfer probabilities. The slope of the fluorescence-irradiation curve will be decreased when the transfer probability is higher than that of the normal acceptor and will be increased when it is lower.

On the contrary influences acting upon the utilization of energy once transferred, are under the conditions described unable to influence fluorescence. This state of affairs was observed in *Chlorella*, in which the decrease in efficiency of photosynthesis, observed at high light intensities due to the limited capacity of the dark reactions, does not manifest itself in fluorescence, so that the relation between fluorescence and incident intensity remains linear. This indicates the presence of an acceptor in abundance, which moreover has led to the conclusion that the uptake of CO<sub>2</sub> is not stoichiometrically related to the concentration of excited chlorophyll, present at each moment.

Certain substances e.g. oxygen and urethane influence the slope of the fluorescence-irradiation curve in *Chlorella*. According to the outline given, these substances must be considered to compete with the normal acceptors at the transfer system and thus influence the stationary concentration of chlorophyll present, by influencing the total transfer probability.

In our study of the initial changes of the fluorescence of chlorophyll in *Chlorella* we concluded to changes of oxidation and reduction processes in the neighbourhood of the chlorophyll on the basis of analogous considerations.

We will now consider the case that the fluorescence is not proportional to the incident intensity over the whole range of intensities studied. Then the ratio between fluorescence and incident intensity is dependent upon the value of this intensity. Only the case that the slope of the curve of fluorescence versus incident intensity increases with increasing intensity will be considered here.

In accordance with the foregoing considerations we may conclude that also here the stationary concentration of excited chlorophyll increases with increasing intensity. As the transfer to a given acceptor system is determined by the transfer probabilities to the various compounds constituting the total acceptor system present, we may conclude that the relative amounts of various compounds of the acceptor systems change from low to high incident intensities. Visualizing the mechanism which can be responsible for this change it is plausible to assume that mole-

cules of the chief compound of the acceptor system, having accepted energy, cannot quickly enough be replaced by new ones in order to remove all energy, present in the excited chlorophyll at high incident intensities. In other words for high intensities the chief acceptor, and hence the whole accepting system, may no longer be considered to be present in abundance. The limitation of the rate of replacing „used” acceptor molecules by fresh ones can in principle have two causes:

1) A system yielding compounds ready to accept energy has a limited capacity, thus preventing the transfer system to be supplied quickly enough with fresh acceptor molecules.

2) A system using molecules that have accepted energy, has a limited capacity, thus preventing used molecules to be quickly enough removed from the energy transfer system. An example of the second type we have met already in *Chlorella*-cells, photosynthesis of which was totally inhibited by cyanide. We will see in the following chapters, that the photosynthesis of purple sulphur bacteria offers examples of both types.

It is evident that besides this the slope of the fluorescence-irradiation curve may be directly influenced by agents which are introduced into the energy accepting system in the same way as described above for linear fluorescence-irradiation curves. A curious but very well explicable phenomenon then arises when an acceptor is introduced that competes with the acceptors present and has a lower transfer probability, but is present in a high concentration. This e.g. is the case when photosynthesis of *Chromatium* is inhibited by azide or by urethane (§§ 17, 18). Then at low intensities the curve of fluorescence against intensity runs above the normal one, at high intensities below it. At low intensities the transfer system can remain saturated with the normal acceptor, and so we observe the decrease of the transfer, which implies an increase of fluorescence by the introduction of a „worse” acceptor. At high intensities the transfer system can not be sufficiently supplied with normal acceptor, so normally the transfer is severely inhibited and may be considerably increased, leading to a decrease of fluorescence, by the introduction of a large amount of an acceptor, although per molecule this acceptor is worse than the normal one.

Summarizing the above considerations the following insight into the significance of fluorescence is obtained. As it is a measure for the concentration of excited chlorophyll, it provides a means to observe all influences exerted on this concentration. Though fluorescence represents only 0.1% of the total energy dissipation, the argumentation given above may have shown that nevertheless it furnishes an excellent index to study to what degree the acceptance of the remaining 99.9% of energy is influenced by agents acting on the process of photosynthesis. The concentration of excited chlorophyll is influenced by changes in the energy transfer from the chlorophyll to the energy accepting system. We can distinguish here direct and indirect influences: direct when the agent, causing the change, itself accepts energy; indirect when it causes changes in other parts of the process which influence the energy accepting system.

It has been pointed out that when fluorescence and irradiation are proportional, only direct influences can occur, whereas, if a proportional relation does not exist both types of influences upon the energy transfer system are possible.

## Chapter II.

### Methods.

#### § 3. Culture method of the bacteria and experimental procedure for the determination of gas exchange.

The cultures of strain D, used in the experiments, were grown in the malate-thiosulphate medium No. 23 (4). They were incubated in the light cabinet at about 30°.

Bottles of 300 ccm were as a rule inoculated with 10—25 ccm of a vigorous culture and could be used the next day, the Trommsdorff-value then being about 7—10 per 5 ccm of culture medium. An especially good development was obtained when an amount (10—25 ccm) of a culture in optimal development was centrifuged, and the collected bacteria, thus freed from the old nutrient medium, were used to inoculate the new bottle. This procedure did not offer full guarantee against contamination. However, since the amount of inoculum was large and the incubation time only ca 16 hours, development of other organisms was never observed. In most cases even a culture of 125 ccm yielded

sufficient bacteria for an experiment with 7—9 vessels. Such a culture was obtained by inoculation with the centrifuged bacteria of 5—7½ ccm of a full-grown culture. This inoculation material was always taken from a small bottle (50 ccm), inoculated and grown under completely aseptic conditions.

The gas exchange was measured with the aid of single WARBURG-manometers, using conical vessels without central tube, with 2 sidebulbs (of the type reproduced in (3) fig. 1). The bacteria were treated in the way described in (4), i.e., they were suspended in distilled water and the suspension was brought into equilibrium with the gas phase to be used in the experiment. Generally the gas phase was  $N_2 + 5\% CO_2$ ; in experiments in which a gaseous hydrogen donor was used, a gas phase containing this donor was applied. In the case of hydrogen as a donor we had at our disposal gas mixtures of  $N_2 + 5\% CO_2 + 15\% H_2$  and  $N_2 + 5\% CO_2 + 30\% H_2$  ready for use in steel flasks. The gas stream was freed from oxygen by passing it through a reduction oven with electrically heated copper gauze. With the aid of a 3-way tap the gas could be led alternatively either through the bacterial suspension or through the set of manometers provided with the vessels to be used in the experiments. The suspension liquid to be used was introduced into the vessels while the gas stream was passing through. Each vessel received as a rule 0.8 ccm 1/6 mol. Na-K-phosphate buffer, 0.2 ccm 6% NaCl, 0.25 ccm water or solution of a hydrogen donor (e.g. thio sulphate) and 0.75 ccm of the bacterial suspension in distilled water.

The final concentration of the bacterial suspension in the vessel was mostly adjusted to 10 TROMMSDORFF-units per ccm („concentration 1", cf. (20)). A few experiments were performed with a concentration of 80 TROMMSDORFF-units per ccm („concentration 3"), being the concentration used formerly (4), whilst in some other experiments the concentration 1/3, equivalent with about 3.3 TROMMSDORFF-units per ccm was used.

The influence of the variation of the ph of the phosphate buffer was subjected to a special investigation (§ 10). Most experiments communicated in the other sections were performed either at ph 6.3 or at ph 7.6. The variations were obtained by mixing different amounts of  $KH_2PO_4$  and  $Na_2HPO_4$  after SÖRENSEN checking the ph with brome thymol blue.

After the vessels had been filled, the gas stream was allowed to pass on for another period of 15 minutes through the manometers with vessels affixed. The gas entered through the tap at the top of the closed leg of the manometer and left through the side bulbs, the stoppers of which had been set in loosely, held open a little by a bent piece of thin copper wire. Hereupon the stoppers were closed, the manometers shut, placed into the thermostat which was kept usually at 29° C., shaken, and allowed to reach temperature equilibrium. The vessels were illuminated in the same way as described before (4) from below with an a.c. sodium lamp. The light was filtered through 1 cm of a 6% solution of copper sulphate to remove red and infrared radiation. The incident intensity at the place of each vessel was measured with an absolutely standardized thermopile. The sidewalls of the vessels were thickly coated with white paint. By means of NG-glasses of SCHOTT & Gen., Jena, fixed to the bottoms of the vessels, as a rule 6 different light intensities were applied simultaneously in one experiment.

In order to reduce the duration of an experiment as much as possible, which was especially important to maintain constant activity during inhibition- or temperature-experiments, readings were taken every 5 minutes. Notwithstanding only small quantities of bacteria were introduced into each vessel, this proved to be quite feasible. The „vessel-constants" of all vessels used, were about 2 (cmm/mm).

In this way successive experiments at 3 to 4 different temperatures, or successive experiments without and with inhibiting substances, could be performed with the same cell suspension. As, moreover, 5 to 7 light intensities could be applied in each experiment, a great regularity of the results was ensured. The effect of inhibition obtained in successive experiments was corroborated by checking the inhibition in a single experiment using a smaller number of light intensities. In all experiments discussed below, the data were obtained with the same cell material, unless stated otherwise.

The experience gathered concerning differences in the infrared absorption spectrum of cultures of strain D (5) made it necessary to examine the absorption spectrum of the cultures. The type with two well distinguishable maxima in the infrared was found almost without exception (cf. § 21).

The total absorption of the bacteria in a vessel illuminated with sodium light was determined with the white sphere (16). With the aid of the necessary blanks and controls it was found in most cases to be 60—65% of the incident light.

The values of ph indicated in the text and in the figures are those of the phosphate-mixtures

prepared; in the experiments these values may undergo more or less complicated changes for various reasons.

First a decrease occurs due to the attainment of equilibrium with the gas mixture containing 5%  $\text{CO}_2$ . This decrease amounts to less than 0.1 ph at ph 6.3; to about 0.3 ph at ph 7.6. This shift in ph is connected with the chemical binding of an amount of carbon dioxide by the suspension medium. During photosynthesis the amount of bound  $\text{CO}_2$  will decrease due to the decrease of the  $\text{CO}_2$  tension in the gas phase of the manometer, and hence the ph will increase again. In principle the decrease in bound carbon dioxide has to be taken into account in the calculation of the gas exchange from the manometric reading. It has been derived theoretically that this correction is small at ph 6.3, however, not quite so at ph 7.6. In the present investigation the changes in carbon dioxide content in the suspension medium as a rule have not been determined, since mostly successive experiments had to be performed with the same cell material. Therefore these corrections have been omitted.

Another reason for changes in carbon dioxide in the suspension medium obtains in experiments with thiosulphate as a hydrogen donor. Here, namely, an uptake of carbon dioxide in the suspension medium takes place due to the presence of sodium ions which remain from the thiosulphate consumed and which ions are for the greater part, but not fully, taken up by the phosphate buffer. This mechanism has been studied previously (4) in detail at ph 6.2, and the reduction factor was established which has to be applied in order to compute the gas exchange from the manometric reading. The magnitude of this correction was found to be about 3% for an amount of photosynthesis of 50 cmm  $\text{CO}_2$ , 10% for 100 cmm, 15% for 150 cmm, 20% for 250 cmm. For the same reasons as mentioned above also these corrections were not established in the present investigation. Since generally the duration of an experiment was restricted as much as possible, the measured uptake of carbon dioxide as a rule did not exceed 150 cmm at the highest light intensity. For higher ph-values the latter correction in general is larger; it counterbalances and even surpasses the change in carbon dioxide, mentioned above. A systematic study of the changes in carbon dioxide content of the suspension medium under these conditions was not yet carried out.

It may be remarked here that in the presence of thiosulphate also the gas exchange in the dark is increased at high ph.

Until these questions have been studied especially, any correction of the manometric readings remains arbitrary, an additional reason to leave them out in this paper. It can, however, be stated that we have computed theoretically the order of magnitude of these corrections and that their magnitude is in no case such as to change qualitatively any result obtained in the present study.

With hydrogen or with hydrogen sulphide as a donor the manometric reading represents a combined uptake of carbon dioxide and of the donor gas. As was established in special experiments (18) the uptake of carbon dioxide may be deemed to amount to 1/3 of the total reading.

The dark metabolism was determined in a separate vessel, wrapped in black cloth, shaken together with the other ones, in order to avoid an extra extension of the duration of the experiments by long dark periods at the beginning and at the end of each experiment. As is known (4) the manometrically measured dark metabolism is greatly reduced by the use of phosphate buffers instead of bicarbonate buffers, probably because this metabolism partly consists of the production of acid. The gas exchange established in the dark was applied as a correction to the values obtained for gas exchange in the light.

#### § 4. Experimental procedure for the measurement of fluorescence.

The fluorescence was measured with an equipment which was mainly the same as described in previous papers. A scheme of this equipment in its present state has been represented in fig. 1. One WARBURG-vessel with suspension could be irradiated with light of a narrow spectral band at about 5900 Å. The fluorescence light was measured with a caesium photo-electric cell connected with an alternating current amplifier. For a discussion of most experimental details we refer to (3), § 2, § 4. The following points however are different or new and are therefore briefly discussed.

a. Coordination of gas exchange and fluorescence measurements. In order to assure the highest attainable coordination of gas exchange and fluorescence measurements, a device was constructed that allowed to use the manometers with white-coated vessels, applied in the gas exchange experiments, also for the measurement of fluorescence. As will be discussed in sections c and d, this procedure had become possible owing to the use of other filters.

Furthermore a shaking apparatus, holding one manometer was built for the fluorescence measurements. It was possible to transfer a manometer from the gas exchange to the fluorescence measuring apparatus, or *vice versa*, within 20 seconds.

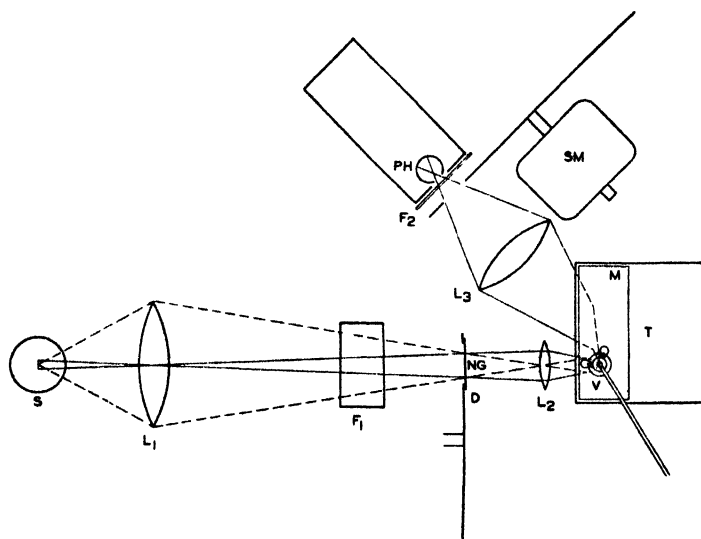


Fig. 1. Scheme of the apparatus for the measurements of fluorescence. S: tungsten filament lamp 500 Watt;  $L_1$ : condensor lens;  $F_1$ : set of filters (see text); D: disk with neutral glasses (NG);  $L_2$ : lense focussing  $L_1$  on Warburg-vessel V, placed in thermostat T; M: mirror placed under  $45^\circ$ ;  $L_3$ : condensor lens, focussing V on photo-electric cell PH, connected with amplifier;  $F_2$ : filter RG 10, 3 mm; SM: synchronic motor with disk intercepting the light 50 times per sec.

compare fluorescence measurements in different vessels. In order to eliminate the influences of differences in shape and constitution of the various vessels, we determined a relative reduction factor for the fluorescence. Therefore we measured quickly, one after the other, at a given incident intensity, the fluorescence in all vessels each filled with the same amount of suspension. The vessels had been pre-exposed simultaneously in the thermostat for gas exchange measurement at about equal intensities till a stationary state was attained (*cf.* below).

The fluorescence intensities measured in this way in various vessels yield the reduction factors for fluorescence, accepting the fluorescence intensity in an arbitrary vessel as unity. The extreme values of the reduction factors thus found, differed 14%.

One might remark that it is not entirely justified to correct the fluorescence measured by a reduction factor as defined above, independent of the shape of the curve representing fluorescence against incident intensity. In fact, some of the causes of the differences of reduction factors affect the incident beam, and should therefore be corrected upon the incident intensity axis, whereas others affect the emerging beam of fluorescence light and should be corrected upon the fluorescence intensity axis. We have, for the sake of simplicity, thrown all corrections upon the latter axis, since we have reasons to believe that the main part of them results from causes of the second kind, and that the error introduced by our procedure is negligible.

c. Light source and filters. As in the case of *Chlorella*, it proved to be impossible to use a sodium lamp for the incident illumination in fluorescence measurements, notwithstanding the fact that the fluorescence spectrum of purple bacteria is situated considerably more towards the infra-red, and thus in principle a better separation of the wave length regions of incident and emitted light would appear conceivable.

It is, of course, possible to illuminate the suspension by Na-light of sufficient intensity just as well as in the gas exchange experiments. However, the necessity to measure the small quantity of fluorescence light emerging through the bottom of the vessel free from any straylight, does not enable to place the sodium lamp directly before the thermostat, as was made in the measurements of gas exchange. On the contrary, the light must be focussed on the vessel by a set of lenses. Further-

These modifications have offered the following advantages:

1. Gas exchange and fluorescence could be measured with the same cell suspension at practically the same time.

2. In many cases it was not necessary to illuminate the vessels in the fluorescence equipment during a long time before readings could be made, because the pre-exposure had already taken place during the gas exchange measurements, and the stationary state attained there was hardly disturbed by the quick transport.

b. Reduction factors for fluorescence. As a consequence of the improved method described it became necessary to

more, since this light contains a fraction of infra-red radiation relatively large as compared with the amount of fluorescence light to be measured, it is necessary to remove this infra-red radiation of the incident beam by filtering much more completely than in the case of gas exchange measurements.

In combination with the relatively small surface brightness of the sodium lamp the mentioned requirements did not allow to obtain an illumination of the vessel with a sufficient intensity.

As the best compromise between spectral purity and sufficient intensity we used a d.c. tungsten filament lamp in combination with a set of filters isolating the desired spectral region. This set consisted of: a) a layer of 1 cm water; b) 6 mm of the glass BG 17 (SCHOTT & Gen.); c) 2 mm of the glass OG 1 (SCHOTT & Gen.) and d) 1 cm of a 20% solution of copper sulphate. The spectral distribution of the light thus isolated was determined; it extended from ca 5400 to ca 6000 Å.

The photo-electric cell with which the intensity of fluorescence light was measured, was shielded from straylight by a filter RG 10 (SCHOTT & Gen.) of 3 mm thickness, transmitting none of the wave lengths present in the illuminating beam and on the other hand absorbing practically no fluorescence light. (cf. the fluorescence spectrum given in (16)).

In a few experiments we omitted filter c) in order to obtain a higher incident intensity.

d. Incomplete complementarity of filters; false light. When we placed an empty vessel into the fluorescence measuring apparatus, our galvanometer indicated an intensity of about 6% of the normal fluorescence of a vessel filled with a suspension of bacteria. This light is mainly due to scattering and to some spurious fluorescence of the white coating of the vessel.

When we placed a plate, coated with magnesium oxide at the same place, an intensity of about 9% of the normal fluorescence was recorded. In connection with the small degree of back scattering and an absorption of 60% of a suspension of bacteria, these data suggest that the systematic error introduced into our measurements, due to false fluorescence light, and due to the incomplete complementarity of our filters, amounts to less than 2%.

e. Sodium light equivalent of the intensities of incident light. Since the spectral composition of the light used was not the same in the experiments on gas exchange and on fluorescence we were obliged to apply a reduction factor  $f$  when comparing intensities in the two cases, as expounded in (3), p. 149. If the intensity  $I_1$  of light of any spectral composition gives rise to the same number of absorbed quanta by the bacterio-chlorophyll as an intensity of  $I_0 = fI_1$  of the D-lines of Na, we say that  $I_1$  has a sodium light equivalent of  $I_0$ . As it was our special purpose to compare gas exchange and fluorescence as closely as possible it was of great importance to know the factor  $f$  accurately.

The reduction factor  $f$  for the incident light can be determined in two ways (i.e.), of which only one could be used successfully in the case of purple bacteria.

In the first method of determination of  $f$  mentioned in our previous paper (3) we made use of the spectral intensity distribution of the incident light and the absorption spectrum of the cells. However, since in the case of purple bacteria, contrary to that of *Chlorella*, carotene absorption is no longer negligible in the spectral region considered, the value obtained for  $f$  in this way turns out too large; it amounted to 0.83.

The second method of determination adheres more closely to the definition of  $f$  and consists in a comparison between the fluorescence upon low incident intensities of the D-lines of Na, and that upon our filtered light. Contrary to what holds for fluorescence measurements as such, the sodium light can be used for this purpose, because a weak intensity suffices and therefore heavy filtering with copper sulphate allows to obtain sufficient spectral purity and removal of the infra-red from the incident radiation.

The measurements yielded values of  $f$  which were independent of the concentration of the bacterial suspension within the experimental error (about 5%) for concentrations up to the one used in our experiments, showing that the self-absorption of fluorescence light has no influence in this respect.

With this method we obtained  $f = 0.66$  which may be considered to be the correct value.

In the case of *Chlorella* both methods yielded the same value; this is comprehensible, since there the absorption of the carotenes hardly plays a rôle in the wavelength region concerned.

In a few cases higher intensities, obtained by omitting the filter OG 1 in the incident beam, were used. As the spectral composition is then changed, a different factor  $f$  holds for this light. To connect intensities in such cases we have not measured  $f$  for the light without OG 1, but we measured the intensity at which the same fluorescence was obtained as was found at a given intensity with OG 1. It appeared that the intensities without OG 1 expressed in sodium equivalents were 3.50 times as high as with OG 1.

f. Remark on the spectral composition of fluorescence light. The intensity of fluorescence may only be considered as a measure for the number of excited chlorophyll molecules when the shape of the fluorescence spectrum is constant in all cases studied (see § 2). We checked the constancy of this spectrum qualitatively by comparing the intensity of fluorescence as measured through a filter RG 10 with that measured through RG 10 + RG 7. In the first case all wave lengths above ca 7800 Å were transmitted and in the second case this limit was shifted to 9500 Å which is about in the middle of the fluorescence spectrum.

The ratio of both measurements was somewhat dependent on the concentration of the suspension which is due to the self-absorption of the fluorescence light, and it was also slightly dependent on temperature, but for all other parameters it was constant, indicating that the shape of the fluorescence spectrum was constant in practically all of our experiments.

Also when irradiation without the OG 1 filter in the incident beam was applied, thus admitting much blue light to the vessel, the ratio of both measurements was hardly changed. This fact suggests, moreover, that the carotenes do not emit an appreciable fluorescence in the spectral region transmitted by RG 10.

In principle f will vary when using bacteria with different absorption spectra, as may occur in the infra-red region (5). However, we have no evidence that changes in absorption occur also in the wave-length region in which the bacteria were irradiated. Moreover, appreciable differences in infra-red absorption were not recorded in the cultures used in the present investigation (§ 21).

g. Intensities applied. Different intensities were obtained by placing suitable combinations of NG-glasses (SCHOTT & Gen.) into the incident beam. The transmission of the filters used, together with their Na-equivalent intensities, expressed in ergs/cm<sup>2</sup> sec are given in table I.

TABLE I  
Incident intensities used in fluorescence measurements.

Transmission of grey filters in %	8.0	13.5	18.4	26.0	34.1	48.2	72.0	100
Sodium equivalent intensity in ergs/cm <sup>2</sup> sec × 10 <sup>4</sup> . . . . .	0.25	0.42	0.57	0.81	1.06	1.49	2.23	3.10

The equivalent maximum intensity, as normally used in the fluorescence measurements, is practically the same as the maximum sodium light intensity, applied in the determinations of the gas exchange. In a few cases (*cf.* c) a 3.50 times higher intensity was applied.

h. Stationary state. In purple sulphur bacteria, as well as in *Chlorella* (3), when admitting the light after a dark period, considerable induction phenomena occur before a stationary value of fluorescence is reached. As it was our present purpose to study the stationary state when measuring a curve of fluorescence versus incident intensity, it was necessary to pre-illuminate the suspension during a sufficiently long time for each intensity applied, as has been done also in our measurements on *Chlorella* (1). As the present arrangement allowed to measure the fluorescence of the same cell suspensions as were used in the gas exchange equipment, it was easy to fulfil this condition approximately, in cases when also in the assimilation experiment a range of light intensities was applied. Then the fluorescence in each vessel was measured quickly at a few intensities in the neighbourhood of the intensity, it had received in the gas exchange equipment.

However, in many experiments only one (high) intensity was applied in the experiments on gas exchange *e.g.*, when pH, concentration of hydrogen donor, CO<sub>2</sub> were introduced as variables, whilst it proved to be of importance to measure also in those cases fluorescence as a function of light intensity. To this purpose we made „quick intensity series” with each vessel.

Hereto we exposed the vessel to the high intensity, that it had received before in the gas exchange equipment and waited a few minutes till a stationary state was reached again. Thereafter a number of decreasing intensities was applied each during 30 sec. to 1 min., that is until fluorescence had again become practically constant. Then again a number of increasing intensities was applied in the same way, the last intensity being equal to the one started with. Also the fluorescence found then was practically equal to the one initially recorded. The curves of fluorescence versus incident intensity thus obtained resembled very closely those obtained in the other way, *viz.*, by exposing a set of vessels to one intensity each during a longer time till the stationary state was certainly reached. In a few cases

a small difference in fluorescence was established, when samples of the suspension were pre-exposed at various intensities and then subjected to the same „quick intensity series” measurement. This small difference, however, does not affect the conclusions drawn from the measurements. Furthermore it is our experience that cells illuminated with a high intensity before measuring the fluorescence at a medium intensity reach the final fluorescence value appreciably sooner than without pre-illumination.

i. Limits of experimental error. Fluorescence-irradiation curves, obtained from identical samples of a suspension, measured immediately one after the other, indicate the mean error occurring in the procedure. Two types of errors present themselves:

1. systematic errors, affecting the whole course of the curve, which amounted to 5% at most. They are due to small errors in quantity of material introduced into the vessels, inaccuracy of the reduction factors for fluorescence, small variations of the position of the vessel in the thermostate at different measurements, etc.

2. non-systematic errors of the order of 2%, which are due to errors of reading, unsystematic variation of the electric a.c. tensions, etc.

In order to avoid misunderstanding it must be remarked, that differences between two curves which would be expected to be equal, are only so small as mentioned, if all conditions concerning the cell material, such as culture medium, age, and pretreatment are identical.

j. Comparison of curves. In order to check the sensitivity of our apparatus from time to time we measured the infra-red fluorescence of a piece of GG 11 glass of Schott & Gen., put at the place of the bottom of the vessel. In various periods of the investigation the sensitivity of the apparatus was not fully equal. It appeared, however, that the initial slope of the curve of fluorescence versus incident intensity was always the same within the limits of error if the fluorescence was expressed in that of the GG 11 glass as a unit, provided no poisons were added to the suspension. In our figures we have therefore in such cases always reduced the fluorescence scales so that exactly the same initial slope resulted. This correction is usually small and may assume larger values only when comparing data which have not been collected within one or a few days. In experiments in which poison was added we have always made measurements without poison too, the latter determining the scale correction. By such correction systematic errors as mentioned in i) disappeared for the greater part. General evidence from our whole material justified the application of this correction for the elimination of the long interval changes of sensitivity of our fluorescence measuring equipment.

### Chapter III.

## General features of the gas exchange and fluorescence curves.

### § 5. The general character of the relation between the intensity of incident light and the velocity of gas exchange.

When a series of vessels with bacteria is illuminated with different intensities of sodium light and the rate of photosynthesis is plotted against the light intensity, a curve of the type given in fig. 2 results. This figure represents an experiment, performed at 29° C at pH 6.3, with gaseous hydrogen as a hydrogen donor. In principle the same curve results with other hydrogen donors.

The curve does not start strictly linearly from the origin; a „sigmoid” shape is apparent, as reported by FRENCH<sup>16</sup> with certain *Athiorhodaceae*. FRENCH found the deviation under discussion more pronounced with higher temperatures; we have got the same impression. For various reasons the lower points are not so very certain, because of 1) the small readings as such, 2) the correction for dark metabolism, which is relatively large

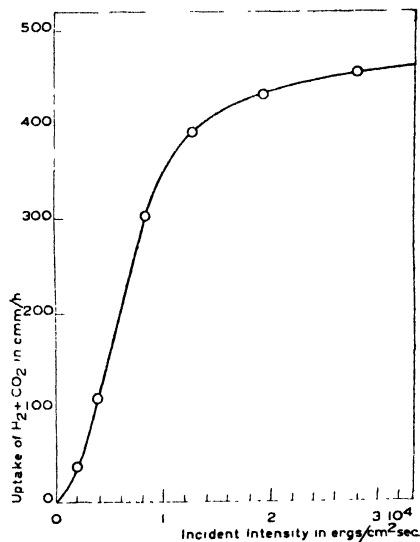


Fig. 2. General type of the relation between the rate of gas exchange in photosynthesis and the intensity of incident light (CO<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub> 15%, pH 6.3, 29°). Exp. of 1.12. '39.



in these cases, 8) the fact that often long-time adaptations occur, especially at low light intensities, the later values tending to straighten the curve. We confine us here to these few remarks, some suggestions concerning an explanation of the phenomenon will be given in § 12.

At higher light intensities photosynthesis has a strictly linear relation with light intensity. At still higher intensities a light saturation is reached of the same type as is known for *Chlorella*. It indicates that besides the light sensitive process at least one other process, independent of light, occurs in the chain of photosynthetic reactions. The conditions causing light saturation will be discussed in the following chapters.

Between the intensity ranges of light limitation and light saturation a transition range is observable. As a rule it is rather extensive. Its relation to the light fall in the suspension has been discussed elsewhere (20). In this range the „photio” and a dark process both influence the bruto

velocity of photosynthesis. The point of intersection of the asymptote for an incident intensity  $I = \infty$  and the tangent of the curve in the part in which photosynthesis is linear in relation to  $I$ , may be called transition point (20), the intensity at which it occurs, transition point intensity.

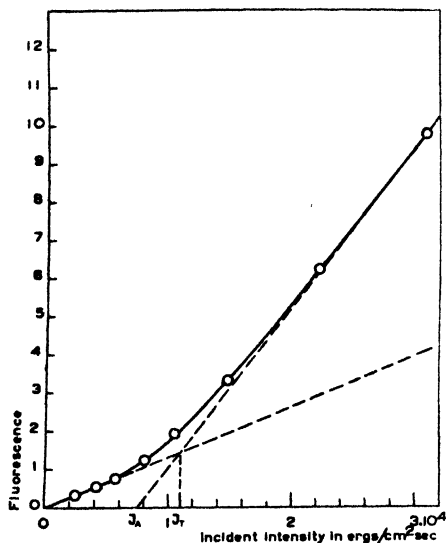


Fig. 3. General type of the relation between the intensity of fluorescence and the intensity of incident light ( $\text{CO}_2$  5%, thio-sulphate 1%, ph 6.8, 29°). Exp. of 21.5.40.

## § 6. The general character of the relation between the intensities of incident light and of fluorescence.

In graphs representing the intensity of fluorescence as a function of the intensity of incident light, the latter has always been expressed in its sodium equivalent (cf. § 4, e) in order to facilitate a comparison with the graphs representing measurements of gas exchange. The intensity of fluorescence is expressed in arbitrary units.

The general appearance of the curve of fluorescence against incident intensity is represented in fig. 3. In this figure fluorescence has been plotted against incident intensity for a suspension with excess of  $\text{CO}_2$  and with  $\text{H}_2$  as a hydrogen donor at a temperature of 29° and at ph 6.8. Its characteristics are qualitatively typical for all curves.

We observe proportionality between fluorescence and incident intensity at low intensities. At high intensities they are also linearly related with a higher slope than for low intensities.

At intermediate intensities a transition from one slope to the other appears. The intensity range at which a deviation of the curves from straight lines is observable will be called transition range; the intersection point of both prolonged straight lines will be called transition point, the intensity at which it occurs: transition point intensity ( $I_T$ ). Thus the curve is defined by the following characteristics: initial slope, final slope, transition range, transition point intensity.

Following the general considerations, given in § 2, the form of the fluorescence curve observed for strain D indicates that the bacterio-chlorophyll does not transfer its energy to a compound present in abundance, but to an acceptor available in a limited concentration, which only at low light intensities appears to be able to accept readily all excitation energy.

In some cases when poison is added to the cells, the curve of fluorescence against incident intensity has a more complicated shape; in some other cases fluorescence remains proportional to the incident intensity over the whole intensity range; these curves will be discussed in the corresponding sections (see §§ 15—18).

## Chapter IV.

## On agents influencing the rate of photosynthesis by their action upon the supply of energy acceptor to the system of energy transfer.

## § 7. Introduction.

As has been expounded in § 2, influencing fluorescence of the photoactive pigment means influencing the transfer of the absorbed light energy from this substance. This can be performed in two ways, viz.,

1) by changing the supply of compounds ready to accept energy,

2) by changing the removal of compounds having accepted energy.

In this chapter we will get acquainted with the hydrogen donors as connected with the supply of compounds active in the transfer of energy from the bacterio-chlorophyll (§ 8). We will see that they have to be subjected to an enzymatic process in order to be enabled to play a rôle in the process of energy transfer (§§ 8, 9). Some properties of the enzymatic process mentioned can be derived from this study, and are presented in §§ 9, 10, 11.

## § 8. The influence of hydrogen donors.

a. The influence of hydrogen donors upon the rate of photosynthesis. In fig. 4 an experiment is represented in which the rate of photosynthesis was measured at a range of concentrations of thiosulphate. All vessels received a high light intensity, not limiting the rate of photosynthesis; an excess of carbon dioxide was present, temp. 29°, ph 6.3. The rate of photosynthesis was derived from the three first readings of 5 minutes. For low concentrations of thiosulphate it appears to be proportional to the concentration; at about 0.4 % saturation with thiosulphate is attained.

Fig. 5 represents an experiment in which both suspensions with a limited amount, and such with excess of thiosulphate, have been compared at 3 different light intensities. The other conditions were the same as above: excess of CO<sub>2</sub>, temp. 29°, ph 6.3. The experiment was repeated several times with the same result. The curves show that at low light intensities the rate of photosynthesis is much less influenced by limited supply of thiosulphate than at high light intensities.

The experiments discussed in (18) have furnished data concerning the rate of photosynthesis in the presence of low concentrations of gaseous hydrogen donors. In the cases of hydrogen and of hydrogen sulphide the rate of photosynthesis is proportional to the concentration, just as with thiosulphate (figs 6, 7).

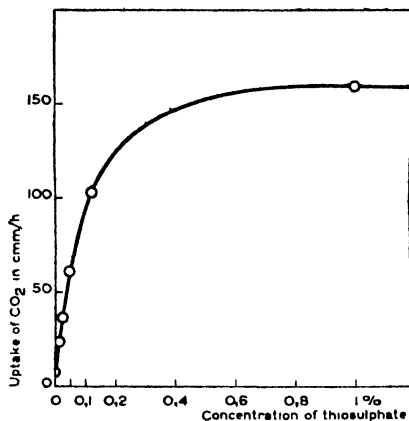


Fig. 4. Influence of the concentration of thiosulphate upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, ph 6.3, 29°, high light intensity). Exp. of 20.5.'40; cf. figs. 11, 11a.

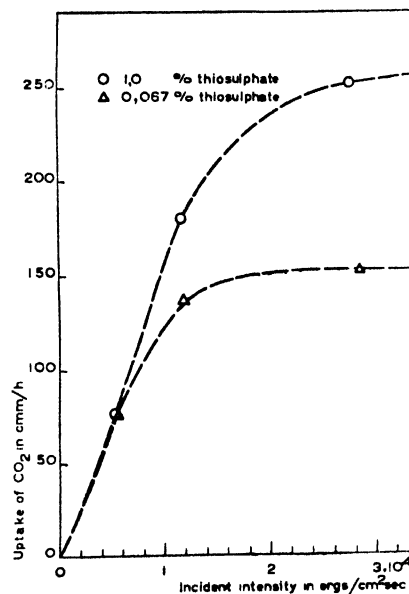


Fig. 5. Influence of the concentration of thiosulphate upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, ph 6.3, 29°). Exp. of 24.1.'40.

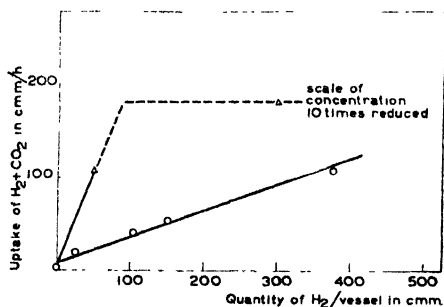


Fig. 6. Influence of the concentration of hydrogen upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.8,  $29^\circ$ , high light intensity) Exp. of 24.10.39.

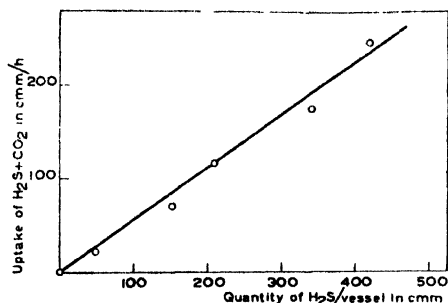


Fig. 7. Influence of the concentration of hydrogen sulphide upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.8,  $29^\circ$ , high light intensity) Exp. of 30.10.39.

Again excess of carbon dioxide was present, temp.  $29^\circ$ , pH 6.8. As far as hydrogen is concerned, the highest dose which can be supplied directly in a manometer (ca 600 cm = 8%) still limited photosynthesis at our highest light intensity and under the other conditions mentioned.

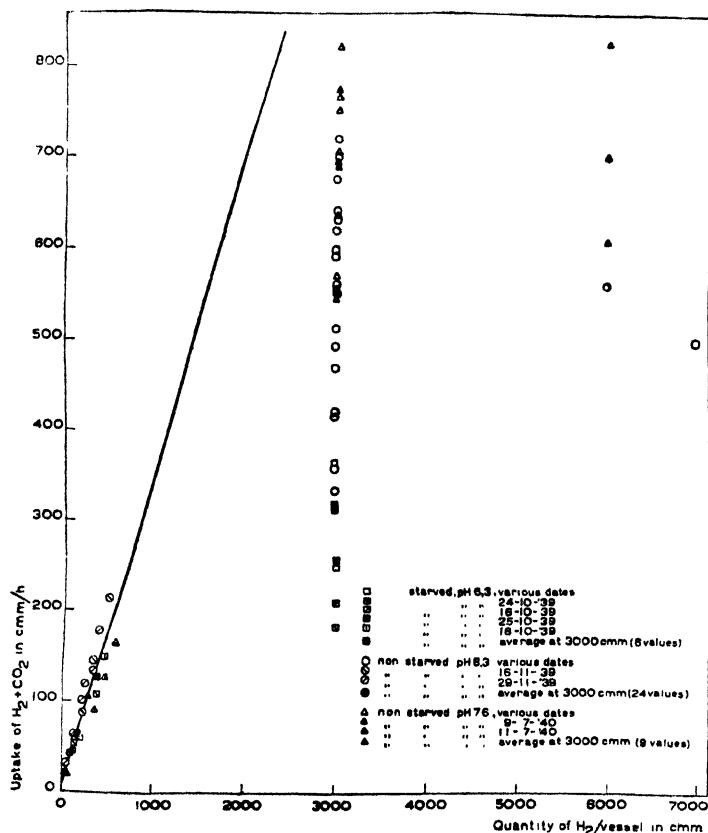


Fig. 8. Influence of the concentration of hydrogen upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, various values of pH and temp., high light intensity) Exps. of various dates.

On the other hand, with 15% of hydrogen (equal to about 3000 cm per vessel), light saturation was observed under the same conditions. Experiments with intermediate concentrations have not been performed so far. Furthermore we found no distinct difference between the rate obtained in the mixtures  $\text{N}_2$ , 15%  $\text{H}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  and  $\text{N}_2$ , 80%  $\text{H}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ . A number of data have been collected in fig. 8. The combined data allow to estimate the concentration of hydrogen at which its external concentration no longer limits photosynthesis. Under the conditions mentioned (excess of  $\text{CO}_2$ , temp.  $29^\circ$ , pH 6.8, our highest light intensity) photosynthesis will become independent of the external pressure of hydrogen at about 10% of hydrogen in the gas phase (equal to about 2000 cm per vessel). At pH 7.6 as a rule this value

lies higher as will be seen in § 10. With bacteria from cultures submitted to a starvation procedure, the saturating concentration of hydrogen was lower than for non-starved bacteria. This starvation procedure consisted of an exposure to high light intensity for several hours in culture liquid without carbon source and without hydrogen donor.

An experiment, completely analogous to the one represented in fig. 5 has not yet been performed with hydrogen. Another experiment, however, furnishes the same conclusion. It is represented in fig. 9. The rate of photosynthesis upon limited amounts of hydrogen has been compared applying high and low light intensities consecutively in one experiment. Excess of carbon dioxide was present, temp. 29°, ph 7.6.

The points 1, 2, 3, 4 have been obtained first, afterwards the points 1', 2', 3', 4' were determined. The shift on the abscis with respect to the corresponding points 1, 2 etc. is due to the decrease of the amount of hydrogen in the vessel during the experiment. The points 1, 2, 3, 4, 3', 4' have all been obtained at high light intensity, the points 1' and 2' with the same samples of suspension at an intensity of about 30% of the former, using the filter SCHOTT NG 4. We are chiefly interested in a comparison of the points 1, 1' and 2, 2'. It is seen that the weakening of the light in this experiment has practically no influence upon the photosynthetic rate. With excess of hydrogen a strong decrease of the rate would have resulted.

Combined with the preceding experiments this justifies the conclusion that the influence of light intensity and concentration of hydrogen donor upon the rate of photosynthesis is completely analogous in the cases of hydrogen and of thiosulphate.

b). The influence of hydrogen donors upon the intensity of fluorescence.

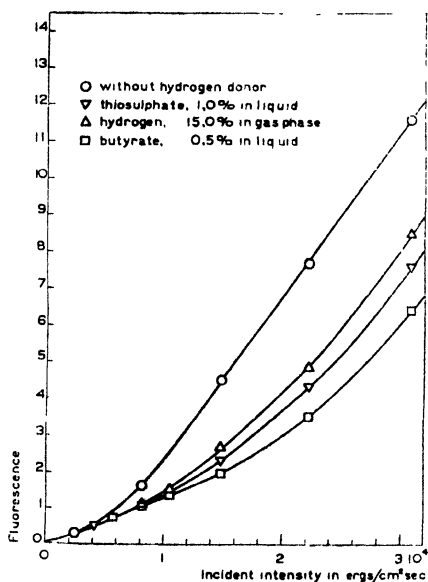


Fig. 10. Influence of various hydrogen donors added in excess upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5% ph 6.3, 29°). Exps. of various dates; cf. fig. 15.

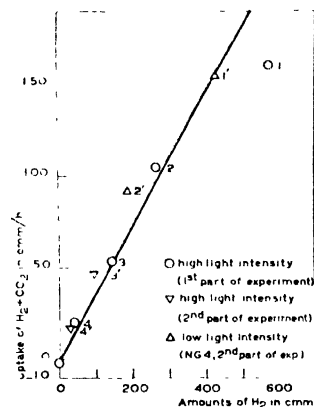


Fig. 9. Influence of the concentration of hydrogen upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, ph 7.6, 29°). Exp. of 9.7.40; cf. fig. 12.

In fig. 10 we represent an experiment, performed at ph 6.3 and 29°. The gasphase was  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ . Curves, showing the intensity of fluorescence against incident intensity are given for a cell suspension to which no hydrogen donor has been added and for those to which various hydrogen donors, viz., sodium thiosulphate, hydrogen and sodium butyrate were added. These donors were present in excess, viz., the gas exchange was not increased by increasing the amount of donor. Carbon dioxide was also present in excess. It is observed that the curves show the general character, described in § 6; all curves show nearly the same initial slope and also the same final slope. However, for the suspensions having received any donor the transition points are situated at much higher incident intensities than that of the donorfree suspension.

The curves, related to the influence of various donors, were obtained in different experiments; it therefore cannot be expected that their transition points would coincide. But in general also with the same cell material coincidence cannot be expected, since e.g. the sensitivity to ph is different for various donors (cf. § 10).

The result obtained shows that in the presence of any of these hydrogen donors the fluorescence

curve remains on its initial slope up to much higher intensities than in the absence of donor.

In fig. 11. curves of fluorescence against intensity are given, obtained from an experiment in which limited amounts of thiosulphate were supplied to a suspension at pH 6.3, 29°, gasphase  $N_2$ , 5%  $CO_2$ . We observe a gradual change of the transition point of the curves with increasing donor concentration. Its situation at the 1% curve may be regarded as a saturation value. The

initial and the final slopes of the curve are the same in all cases. In fig. 11a the intensities  $I_A$  (cf. fig. 8) of fig. 11 as a function of the concentration of thiosulphate are given, the curve starts linearly, whereas afterwards saturation is reached. We will discuss elsewhere that the value  $I_A$  is related to the maximum velocity of photosynthesis (13).

With hydrogen so far the influence of concentration has not been studied in so much detail as in the case of thiosulphate. Fig. 12 shows the influence of addition of small amounts of hydrogen and of excess hydrogen in comparison with the donor free suspension; the other conditions were: excess of carbon dioxide, pH 7.6, temp. 29°. Fig. 13 shows

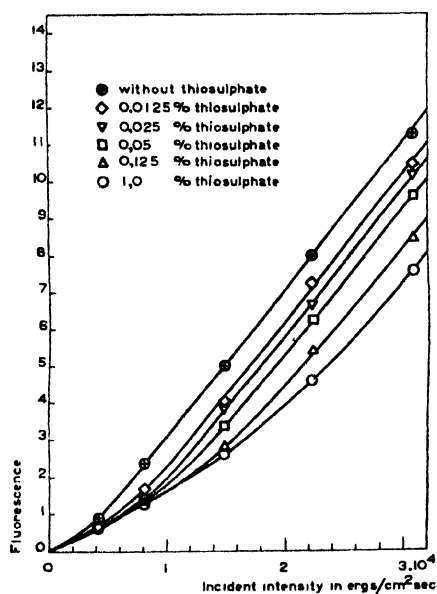


Fig. 11. Influence of the concentration of thiosulphate upon the intensity of fluorescence ( $CO_2$  5%, pH 6.3, 29°) Exp. of 20.5.40; cf. fig. 4.

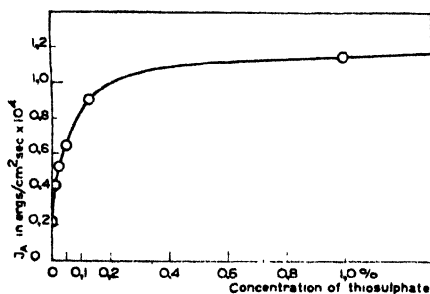


Fig. 11a.  $I_A$  as a function of thiosulphate concentration, taken from fig. 11; cf. fig. 4.

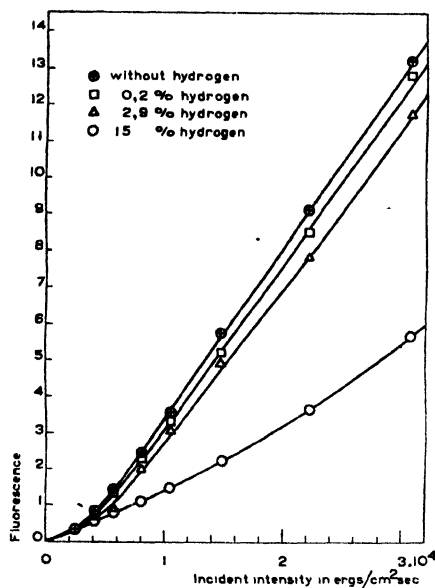


Fig. 12. Influence of the concentration of hydrogen upon the intensity of fluorescence ( $CO_2$  5%, pH 7.6, 29°) Exp. of 9.7.40; cf. fig. 9.

the fluorescence of suspensions in equilibrium with 15% and with 35% of hydrogen. These curves are nearly the same. So also with hydrogen at a given external concentration saturation is reached.

With hydrogen as a donor often a special phenomenon is observed, which will be discussed in § 23.

The curves of fluorescence against incident intensity show the same slope at low intensities in the presence and in the absence of hydrogen donor, notwithstanding their wide deviation at higher ones. This fact may be due to the presence of some intra-cellular hydrogen donor. One

may expect that a suspension of cells, completely free from donor, would give a straight line with a slope equal to the final one common to all curves. This assumption has been supported by experiments with cells that had been „starved”, i.e., exposed to high light intensity for some time without external hydrogen donors. After this treatment the cells will contain only a very small amount of donor. Indeed this treatment causes a shift of the transition point intensity to still lower values if no donor is supplied externally (fig. 14).

Since the addition of donor in the experiments, described so far, means also that the process of photosynthesis is allowed to proceed, one might object that the changes in fluorescence are not caused by an action of the hydrogen donor as such, but merely by the fact that assimilation proceeds.

Therefore also the effect of the addition of donor in the absence of carbon dioxide has been studied. In such cases photosynthesis is largely suppressed (cf. § 14), and indirect effects due to assimilation are thus prevented. The effect of addition of thio-sulphate, hydrogen and butyrate to suspensions in equilibrium with a gas phase without carbon dioxide, is represented in fig. 15. This figure resem-

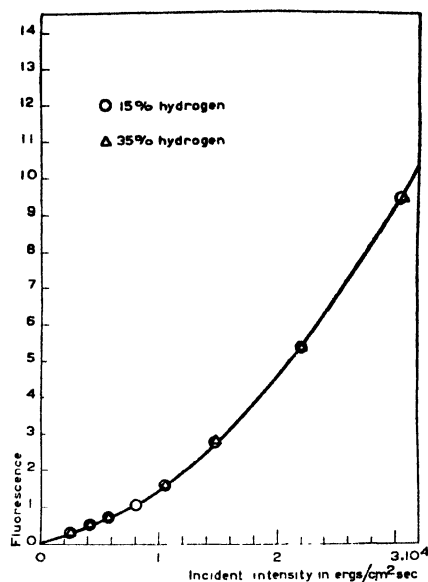


Fig. 13. Influence of the concentration of hydrogen upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.3,  $29^\circ$ ). Exp. of 31.1.'40.

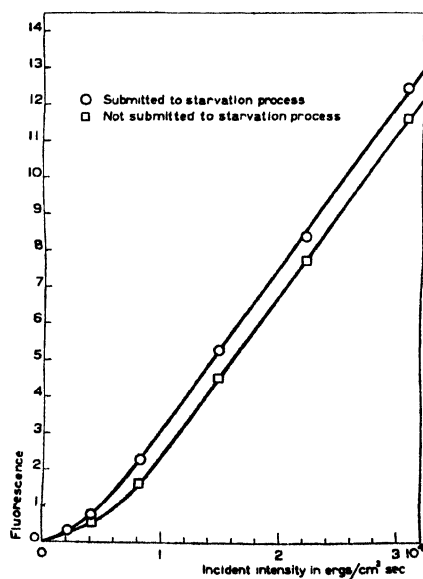


Fig. 14. Influence of starvation procedure upon the intensity of fluorescence in the absence of a hydrogen donor ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.3,  $29^\circ$ ) Exps. of 18.12.'39 and 21.12.'39.

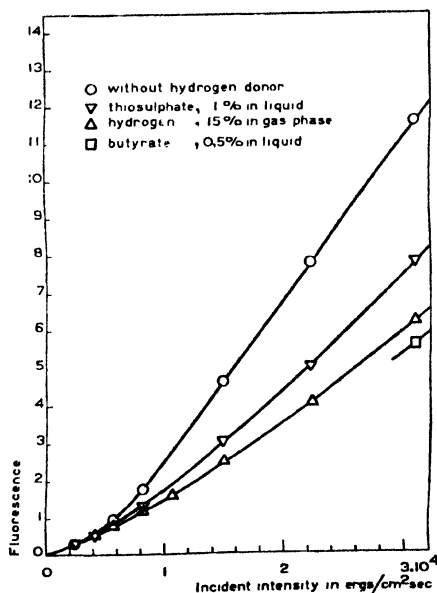


Fig. 15. Influence of various hydrogen donors, added in excess, upon the intensity of fluorescence in the absence of  $\text{CO}_2$  (pH 6.3,  $29^\circ$ ) Exps. of various dates; cf. fig. 10.

bles closely fig. 10. The obvious decrease of fluorescence upon the addition of the hydrogen donors also in this case shows that the influence of the hydrogen donors upon the fluorescence exists independently of the rate of carbon dioxide reduction.

Fig. 16 shows the same for hydrogen sulphide. It has not been collected with the other data in fig. 15 related to excess of donor, since in the case of hydrogen sulphide only relatively low doses can be applied, higher ones poisoning some other catalytic system.

The same general conclusion may be drawn also from a comparison of fluorescence in suspensions without hydrogen donor and with hydrogen donor in the presence of a concentration of cyanide that totally inhibits photosynthesis. Fig. 17 shows, that also in this case the hydrogen donor exerts the same influence. We will see later on that under the conditions chosen both carbon dioxide and cyanide themselves have no direct influence upon fluorescence. (Chapter V).

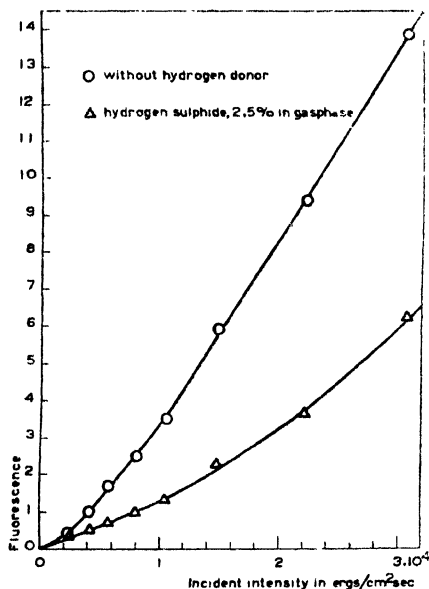


Fig. 16. Influence of hydrogen sulphide (2.5% in gas phase) upon the intensity of fluorescence (no CO<sub>2</sub>, pH 6.3, 29°) Exp. of 7.2.40

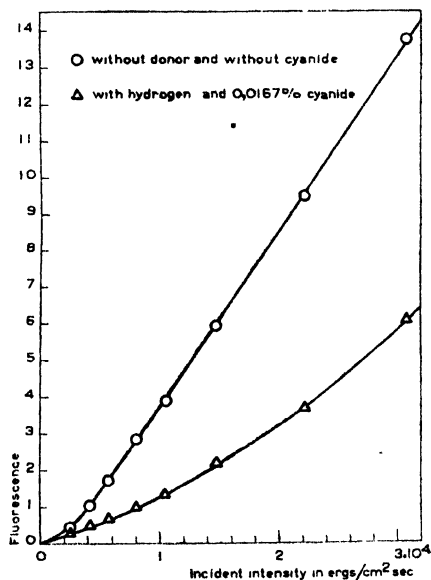


Fig. 17. Influence of hydrogen donor, added in excess, upon the intensity of fluorescence in the presence of cyanide (CO<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub> 15%, pH 6.3, 29°, KCN 0.0167%) Exp. of 30.1.40.

It will be observed that in the case of inhibited photosynthesis the curves of fluorescence in the presence of hydrogen donor are somewhat more „straight” than without inhibition. This also will be discussed later on (§§ 14,15).

c) Discussion. We have seen that without external supply of hydrogen donor the curve of fluorescence against incident intensity changes from its initial to its final slope at a much lower light intensity than in the presence of an excess of hydrogen donor. Compared at a certain (high) light intensity fluorescence is much lower with, than without hydrogen donor. So addition of hydrogen donor distinctly influences fluorescence. This influence is a direct one, since it occurs in an analogous way when photosynthesis is inhibited.

Now, as we have seen in § 2, fluorescence may be considered as a measure for the concentration of excited bacterio-chlorophyll molecules. This concentration is controlled by the velocities of excitation, and of transfer and annihilation of the excitation energy. The rate of excitation itself can be considered to be only dependent upon the number of quanta absorbed. The probabilities for transfer and annihilation are dependent on the conditions at the transfer system, as has been exposed in § 2. We may therefore conclude that the hydrogen donors

are intimately connected with the transfer of energy from bacterio-chlorophyll to the energy consuming systems.

Without hydrogen donor this transfer of energy appears to be bad, resulting in a high fluorescence. With hydrogen donor it is considerably increased up to a certain light intensity; for still higher intensities the transfer efficiency decreases again asymptotically to the same value as without donor.

In fig. 4 a curve was shown representing the rate of photosynthesis in relation to the concentration of thiosulphate added. In the same experiment the data of the fluorescence diagram given in figs. 11 and 11a were obtained. The parallelism with the simultaneous measurement of gas exchange is obvious, cf. also fig. 18 in which the data of figs. 4 and 11a are plotted against each other. The saturation values for gas exchange and fluorescence are obtained at about the same concentration of thiosulphate (ca 0.4%). Above this concentration neither gas exchange nor fluorescence can any more be influenced by a further increase of concentration. This means that a further influence of the hydrogen donor upon the transfer of energy is not possible. An analogous situation is observed in the case of hydrogen as a donor.

The fact that increase of the external concentration of a hydrogen donor does not give a further increase of the energy transfer, and thus no further increase of the replacement of used molecules by fresh ones, suggests that not the limited capacity of the transfer system itself is responsible for the saturation observed, unless at the transfer system a reaction of limited capacity would follow the acceptance of energy. We will show afterwards (§ 14) that other phenomena point against the latter possibility. Therefore, we are led to the assumption that a special cellular mechanism is intercalated between the donor supplied externally, and its effect at the photoactive system. This mechanism may be described as an enzymatic process in which the hydrogen donor is involved and the result of which is that the energy transfer system receives a suitable energy acceptor. So we are led to the conclusion that the hydrogen donors do not themselves occupy the system of energy transfer.

Further arguments for postulating a special intra-cellular system between the donor and the transfer system are furnished by the observations to be discussed in the following sections, viz., that the supply of energy acceptor to the transfer system is strongly influenced by temperature and pH; furthermore the latter sensitivity is different for different hydrogen donors. Moreover, another argument for the existence of a special system for donor transformation is derived from the fact that the fluorescence of a colloidal extract of the bacteria prepared in the way described in (21) so as to leave its absorption spectrum unaltered, does not or hardly react upon the addition of hydrogen donors (see § 22).

It may be asked in this connection whether the normal „BLACKMAN”-process limiting the efficiency of increasing light intensities in the case of excess of hydrogen donor and excess of carbon dioxide is identical with this process supplying the transfer-system with energy acceptor. We have indications that this indeed may be the case under various conditions. Then the transition point of the curves for fluorescence and gas exchange are found at about the same light intensity (cf. also § 19).

In the donor-free case there is a transfer, which chiefly can be considered as a loss of energy since the energy is not transferred to the process of photosynthesis.

The slope of the fluorescence curve of a donor free suspension is about 4 times as steep as the (initial) slope in the presence of donor, thus the transfer probability of energy without donor must be about 1/4 of that with donor. This indicates the preference for the issue of energy along places occupied by acceptor molecules above that along the acceptor free places. Also in the presence of donor a loss of about 25% at the system of energy transfer may occur, although

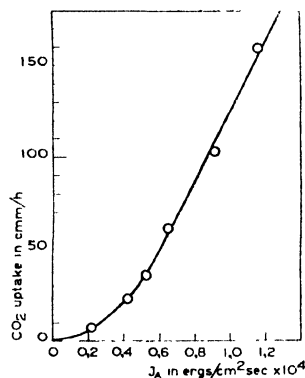


Fig. 18. Comparison of the rate of  $CO_2$ -uptake and  $J_A$ , taken from figs. 4 and 11a.



in this case the loss can also well be smaller. We have no definite idea as to which other acceptor this lost energy is transferred.

We have seen that by limiting the supply of hydrogen donor the rate of photosynthesis is hardly decreased at low light intensities, whereas it is strongly decreased at high ones. We must assume that the transfer of energy at the photic system is controlled by the local concentration of energy acceptor. This concentration in its turn will be determined by supply and consumption. With low external concentrations of hydrogen donor the supply per unit of time is low. Only in the dark and at low light intensities this supply will be able to keep the places of the transfer system continually occupied. At higher light intensities the demand will surpass the supply, the transfer system becomes „empty”, which means that the next transfer actions are impeded; ultimately an equilibrium with a definite part of the transfer system stationarily occupied, establishes itself. The higher the light intensity, the smaller is this stationarily occupied part.

When the hydrogen donor is supplied externally in a higher concentration the mechanism described will show a shift towards higher light intensities. As far as the transfer system was totally occupied in the case of lower concentration, no changes occur. However, with increasing light intensities this situation will prevail over a longer range of intensities thus allowing a higher maximum transfer and so a higher maximum photosynthesis. If thus there exists a maximum rate of supply and an increasing rate of consumption with increasing light intensity, the concentration of energy acceptor present at the transfer system will be smaller the higher the light intensity is. The fact that the fluorescence curve for a suspension with hydrogen donor at high incident intensities approaches the same slope as a donor free suspension suggests that at high intensities in the stationary state of illumination practically no acceptor is present at the system of energy transfer.

Concluding this section we may state that, due to the combined study of the fluorescence of bacterio-chlorophyll and the rate of gas exchange, we have got acquainted with the place at which the hydrogen donor enters into the process of photosynthesis. Evidently the donor forms an essential link in the supply of a suitable energy acceptor to the system transferring the energy from the excited bacterio-chlorophyll.

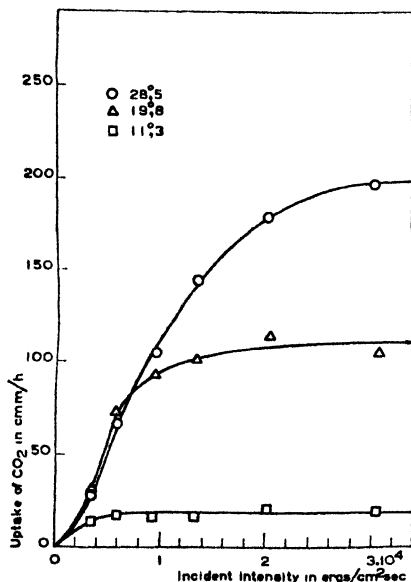


Fig. 19. Influence of temperature upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, thio-sulphate 1%, pH 6.8). Exp. of 14.12.'39.

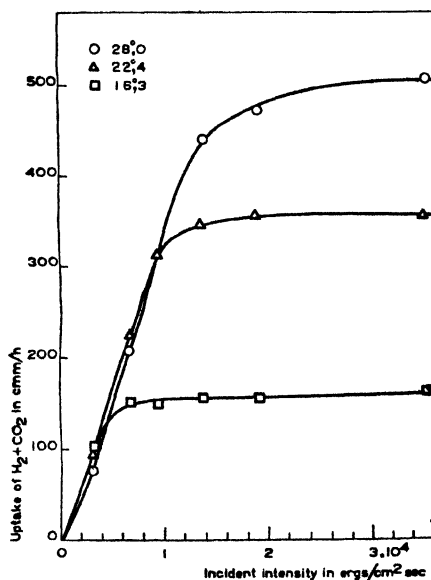


Fig. 20. Influence of temperature upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6). Exp. of 10.7.40.

## § 9. The influence of temperature.

a. The influence of temperature on gas exchange. In green plant cells the relation of photosynthesis to temperature and light intensity is well known. So in *Chlorella* it has been found that photosynthesis is hardly dependent on temperature as far as it is limited by the light intensity; on the contrary it is strongly sensitive to temperature changes in the range of light saturation. A similar behaviour is observed with purple sulphur bacteria, both with thiosulphate and with hydrogen as a donor (figs. 19 and 20). In the light limiting range the curves for various temperatures practically coincide. At low intensities the values for the highest temperature are even often somewhat lower than those for the lower temperatures. This may be described as a more pronounced S-shape of the curve at higher temperatures, as was also observed by FRENCH<sup>19</sup>). At higher intensities the curves run parallelly, but the transition point intensity is strongly dependent on temperature. Consequently the saturation value of the assimilatory rate strongly differs for various temperatures.

In Table II some temperature coefficients for the light saturation range have been collected. It appears that the  $Q_5$ -value found for the lowest temperature interval is fairly constant (with the exception of the experiment of 14.12.'39 in which the value recorded at 11° was exceptionally low) and amounts to ca 1.80, corresponding with a value for the energy of activation  $A = 19.3$  k.cal. in the ARRHENIUS equation. In the higher temperature intervals generally lower  $Q_5$ -values were recorded. This may have a real significance, indicating that with higher temperatures another dark process with a lower temperature coefficient may control the bruto velocity. On the other hand, however, these lower coefficients may partly be due to a decreased activity of the bacteria in the course of the experiments, as mostly the data for these temperature intervals were obtained at a later moment in the experiment. We

TABLE II.  
Temperature coefficients of photosynthesis under light saturation.

Date	Concentration of suspension	Donor	ph	Temp. interval in °C	$Q_5$	Ave. range	A in k.cal.	Temp. interval in °C	$Q_5$	Ave. range	A in k.cal.	Temp. interval in °C	$Q_5$	A in k.cal.
20.12.'37	3	thiosulphate	6.3	10-17	1.81			17-23	(1.37)					
21.12.'37	"	"	"	11-20	1.82			17-23	1.69					
9. 2.'38	"	"	"	11-17	1.78			17-23	1.48					
11. 2.'38	"	"	"	11-17	1.89			17-23	1.57					
9. 2.'38	1 *	"	"	11-17	1.69		19.4							
11. 2.'38	"	"	"	11-17	1.87	1.79								
12. 9.'38	"	"	"	11-17	1.73									
16. 9.'38	"	"	"	11-17				17.6-29	1.55					
14.12.'39	"	"	"	11-19.8	(2.60)			19.8-28.5	1.47		12.8			
15.12.'39	"	"	"	11-19.6	1.91			19.6-28.5	1.91					
10. 7.'40	"	hydrogen	7.6					16.3-22.4	1.89		22.0	22.4-28	1.39	11.6

\*) Concentration normally used.

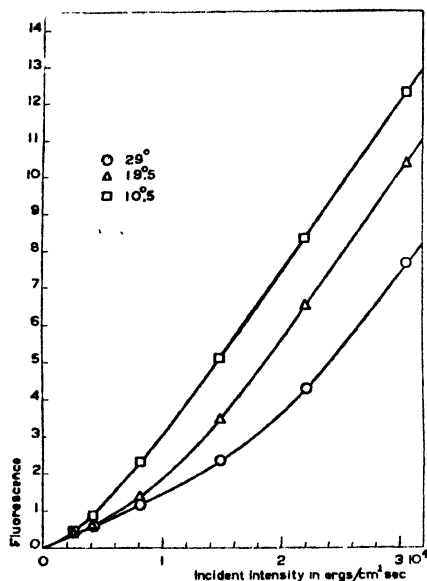


Fig. 21. Influence of temperature upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, thiosulphate 1%, pH 6.8.). Exp. of 15.12.'39.

therefore will not discuss these data theoretically. It is perhaps useful to emphasize in this connection that for a theoretical discussion of  $Q_s$ -values it is necessary to make a special study of the limiting processes in the successive temperature intervals, in order to determine in how far shifts in these values are more or less incidental or due to methodical complications, or are characteristics of the process studied. Evidence obtained in other fields suggests that a discussion of characteristics of incidentally recorded temperature curves as a rule can not reveal fundamental characteristics of a biological process (cf. e.g. (22, 23)). As a special study of temperature coefficients has not yet been carried out in the case of photosynthesis, a detailed discussion of this matter as set up e.g. by WOHL (24) seems somewhat premature.

b. The influence of temperature on fluorescence. In fig. 21 we represent a set of curves obtained with a suspension at various temperatures, with thiosulphate as a hydrogen donor, at pH 6.8. We notice that the initial slope is the same for all temperatures. The final slope is only slightly dependent on temperature,  $Q_{10}$  of this slope is about 0.9. The transition point intensity, however, is strongly dependent on temperature.

In fig. 22 an experiment is represented on the influence of temperature upon fluorescence with hydrogen as a donor at pH 7.6 Fig. 23 presents some observations made in the same experiment at still higher temperatures and

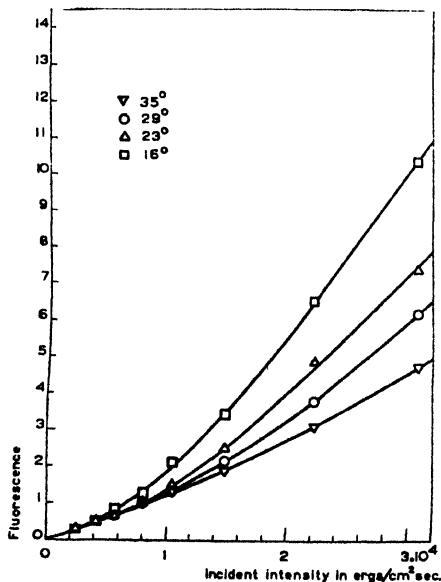


Fig. 22. Influence of temperature upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6). Exp. of 10.7.'40.

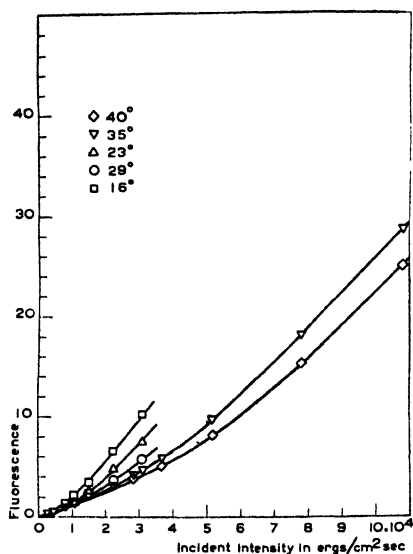


Fig. 23. Influence of temperature upon the intensity of fluorescence in a large range of light intensities ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6). Exp. of 10.7.'40.

at higher light intensities (up to 3.5 times as high as ordinarily, *cf.* § 4). These observations show very clearly that the final slope is nearly the same at very different temperatures. Also the initial slope is the same, just as was observed with thiosulphate. Again the transition point intensity is strongly dependent on temperature. The parallel measurement of gas exchange is represented in fig. 20.

c. Discussion. The evidence brought forward in § 8 led to the conclusion that some enzymatic process connected with the supply of the energy transfer system with energy acceptor may constitute a „limiting factor” in photosynthesis. It causes light saturation under conditions of excessive external supply of hydrogen donor and carbon dioxide. The evidence presented in this section furnishes strong arguments in favour of the view that the influence of temperature upon the rate of photosynthesis reflects the influence of temperature upon this process. This is especially suggested by the observation that an increase of temperature in the presence of an excess of hydrogen donor influences the fluorescence curves in exactly the same way as an increase of the external concentrations of hydrogen donor (§ 8). Furthermore the agreement observed in many cases between the transition point intensities of fluorescence and gas exchange is an argument in favour of this view.

So the temperature sensitivity of the reaction that supplies energy acceptor to the energy transfer system may be considered to be the cause for the parallel changes in fluorescence and in gas exchange. That the transfer action as such is not strongly sensitive to temperature is shown by the fact that both the initial and the final slope of the fluorescence curves are practically independent of temperature.

With hydrogen at pH 7.6 at various temperatures the fluorescence transition point was found at a higher intensity than the one of gas exchange. It is conceivable that under these conditions light saturation is not caused by the same process in the measurements of gas exchange and of fluorescence. This may especially be advanced, since we have evidence for the existence of a second dark process, which may limit the gas exchange in a similar way as the one discussed so far, whilst only slightly and indirectly influencing fluorescence (*cf.* § 14, § 19).

## § 10. The influence of pH.

a. The influence of pH on gas exchange. Experiments on the influence of pH on photosynthesis of *Chromatium*, strain D, in phosphate buffer with thiosulphate as a hydrogen donor, had yielded the unexpected result that the rate of photosynthesis at high light intensities was much larger at pH 6.2 than at pH 7.0 (4). This was especially unexpected, because the optimum for growth in malate-thiosulphate-media was found at about pH 7.4 (4). It has also been proved that the observed effect is real, and not due to concurrent chemical conversions in the medium (4).

A more complete record of the relation under discussion is represented in fig. 24; the observations were made with high light intensity. Just as was found previously, the rate of photosynthesis is not much different from pH 6.0 to pH 6.6; at higher pH-values a considerable decrease is observed. For the higher pH-values the amount of extra-uptake of  $\text{CO}_2$  in the presence of thiosulphate becomes larger. In a curve, corrected for this uptake, the difference between low and high pH-values would still be larger (*cf.* also § 8). As far as our experience goes, the effect is far less pronounced at low light intensities, *cf.* fig. 25.

Also the influence of pH upon the rate of photosynthesis with hydrogen as a donor was studied. In fig. 26 and 27 we present an experiment in which the rate of photosynthesis at

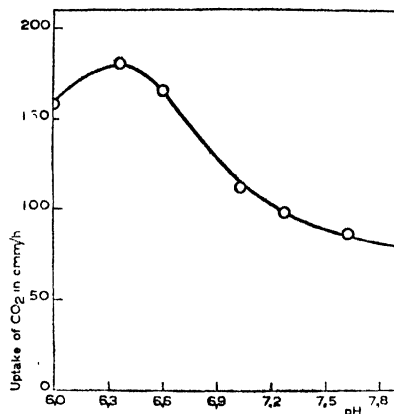


Fig. 24. Influence of pH upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, thiosulphate 1%, 29°, high light intensity). Exp. of 16.4.40.

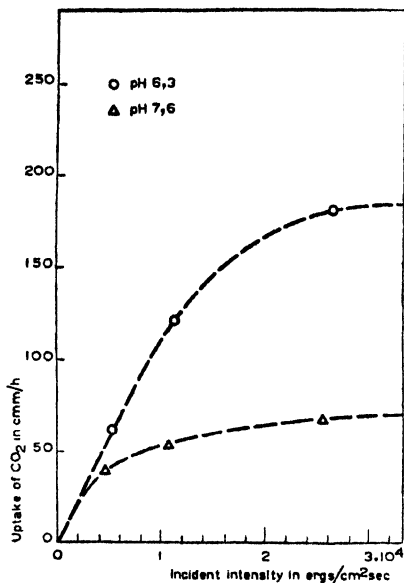


Fig. 25. Influence of pH upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, thiosulphate 1%, 29°). Exp. of 21.5.40.

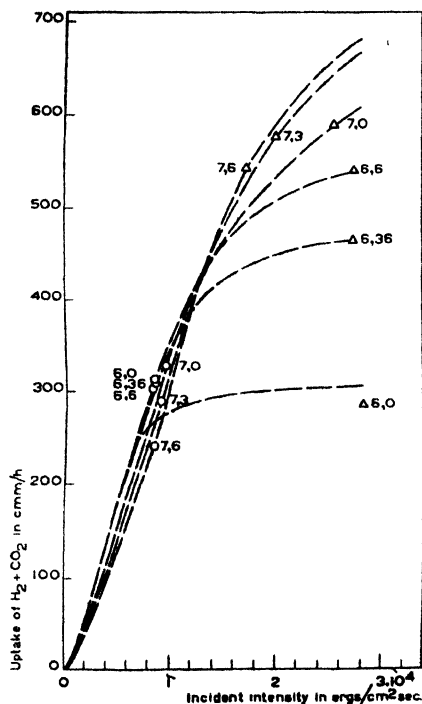


Fig. 26. Influence of pH upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub> 15%, 29°). Exp. of 30.4.40.

various pH, both at a high and at a low light intensity, was established. Unfortunately it was not possible to apply a sufficiently high intensity to all vessels. Therefore, we have traced a curve through each set of two points obtained (fig. 26), which was possible owing to the general evidence collected in various other experiments. For the highest pH-values light saturation has not been reached. With the aid of these curves the relation of the rate of photosynthesis to pH at high intensities can fairly well be established. It is thus seen that at high light intensities the rate strongly increases with increasing pH (fig. 27). This conclusion has been confirmed at various other occasions. At low light intensities a less pronounced sensitivity towards pH was observed, just as was the case with thiosulphate; the rate is rather constant from pH 6.0 to pH 7.0, a slight decrease occurs at higher pH-values. This decrease is perhaps chiefly due to the often observed fact that with hydrogen at high pH-values the sigmoid shape of the photosynthesis-intensity curve is more pronounced than at lower pH. At medium intensities the steepness of the curve

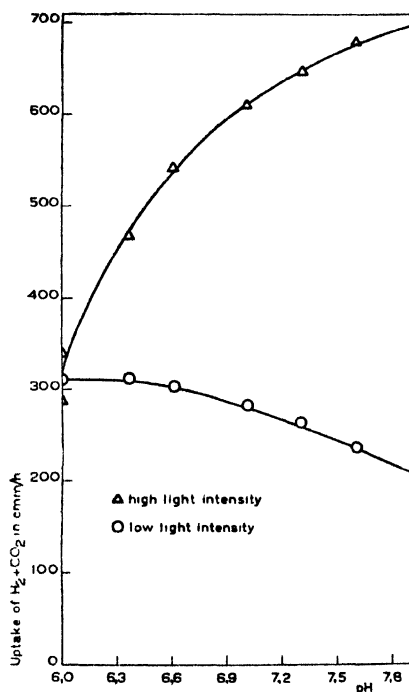


Fig. 27. Influence of pH upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub> 15%, 29°) derived from Fig. 26 for incident intensity =  $2.8 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec ( $\Delta$ ) and for incident intensity =  $0.8 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec (O).

increases somewhat with increasing pH, as may be seen from figs. 26 and 28 and as was also observed at various other occasions.

From the experiments reported we can conclude that especially the system limiting the rate of photosynthesis at light saturation is sensitive towards pH. This sensitivity has a different character for various hydrogen donors, since, in the pH-range studied, with thiosulphate the rate decreases towards higher pH, whilst with hydrogen it increases in this direction.

b. The influence of pH on fluorescence. In fig. 29 we present data concerning the influence of pH on fluorescence at high light intensity with thiosulphate as a hydrogen donor. We observe that under these conditions fluorescence increases with pH.

Fig. 30 shows the influence of pH in the presence of thiosulphate at different incident intensities. The curves obtained have the same initial and the same final slopes but different transition points, just as was observed with various amounts of hydrogen donor or with various temperatures.

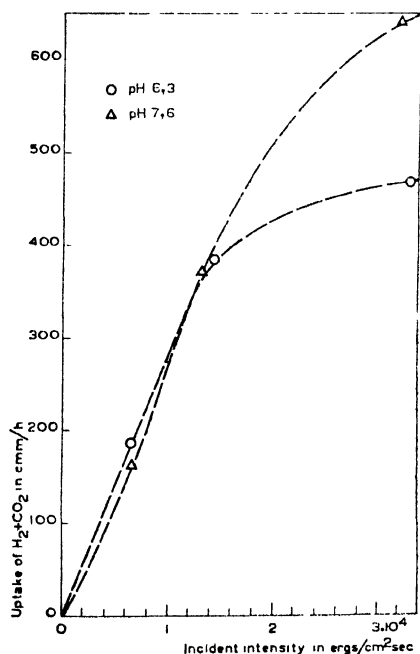


Fig. 28. Influence of pH upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%,  $29^\circ$ ). Exp. of 9.7.'40.

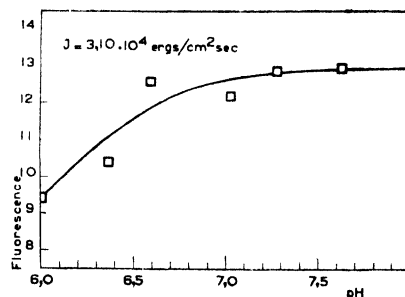


Fig. 29. Influence of pH upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, thiosulphate 1%,  $29^\circ$ , high light intensity). Exp. of 16.4.'40.

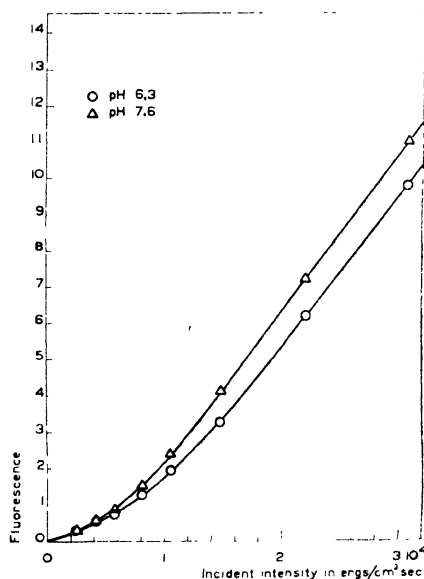


Fig. 30. Influence of pH upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, thiosulphate 1%,  $29^\circ$ ). Exp. of 21.5.'40.

Fig. 31 shows the influence of pH on fluorescence at a given high light intensity and also at a low one with hydrogen as a donor. Just as in the case of gas exchange (cf. figs. 26 and 27 which belong to the same experiment as fig. 31) the influence is more marked at high intensity than at low intensity. The influence of pH in the presence of hydrogen is contrary to that in the presence of thiosulphate, as was also observed of the gas exchange.

Fig. 32 shows the influence of pH on fluorescence at different incident intensities, with

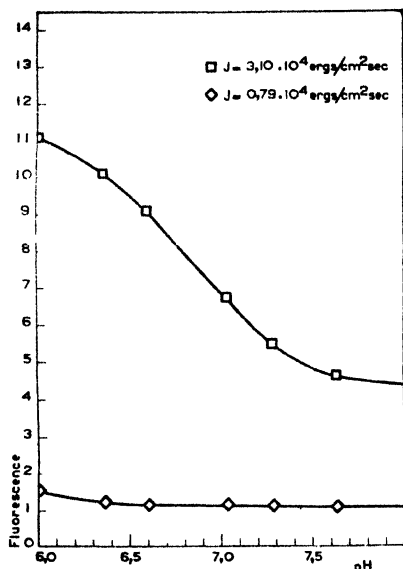


Fig. 31. Influence of pH upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%,  $29^\circ$ , two different light intensities).  
Exp. of 30.4.'40.

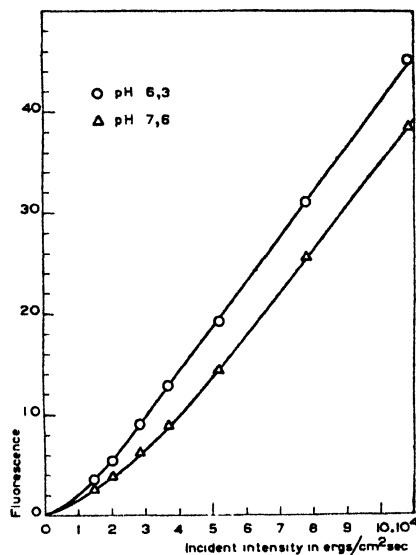


Fig. 32. Influence of pH upon the intensity of fluorescence in a large range of light intensities ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%,  $29^\circ$ ).  
Exp. of 9.7.'40.

hydrogen as a donor; these data belong to the same experiment as the gas exchange data of fig. 28. The character of the curves is the same as in the case of thiosulphate, however, with hydrogen the curve of the higher pH maintains its initial slope up to higher intensities. In this experiment incident energies were applied up to 3.5 times higher than the usual maximum intensity (cf. § 4). The final slope of the curves is the same for both pH-values, but the transition point is different.

We may conclude that the influence of pH on fluorescence is of the same type as that of the concentration of hydrogen donor and that of temperature.

c. Discussion. Just as was the case with variations in concentration of hydrogen donor (§ 8), and with influences of temperature (§ 9), we are struck also in the case of pH by the remarkable relation that exists between the behaviour of gas exchange and that of fluorescence. If gas exchange increases, fluorescence decreases and *vice versa* (cf. figs 24 and 29, 25 and 30, 26 and 31, 28 and 32). The intensity transition points for gas exchange and fluorescence show similar shifts as a function of pH. We have already seen that the influence of pH is less pronounced at low light intensities than at high ones both for gas exchange and for fluorescence. This indicates that the process, limiting the total rate of gas exchange at light saturation is sensitive to pH.

The evidence presented in this section leads to the conclusion that the sensitivity to pH must be considered as a property of the system reacting with the hydrogen donors and supplying the system of energy transfer with energy acceptor. It is well conceivable that this sensitivity is different for various hydrogen donors as has been actually observed for hydrogen and for thiosulphate. However, so far the causes for this difference are not understood.

## § 11. On the combined use of two hydrogen donors.

We know from the preceding sections that the hydrogen donors which we have studied somewhat more in detail, *viz.*, hydrogen and thiosulphate, are well assimilated under the conditions of our experiments. If a sufficient amount of one of these donors is added, almost the entire gas exchange measured runs at the expense of this donor, the gas exchange of the auto-assimilation then being negligible. The foregoing experiments have led to the supposition, that the

hydrogen donor reacts with an enzyme system supplying the energy transfer system with energy acceptor. An insight into the behaviour of the enzyme system involved (indicated below as system I) towards different donors may be obtained from the study of gas exchange and fluorescence with two hydrogen donors simultaneously supplied, each present in abundance.

So far we have carried out such experiments with hydrogen and thiosulphate at pH 6.3, both at a high and at a low light intensity. At the time these experiments were made, it was not yet known that the influence of pH on the rate of photosynthesis differs according to the nature of the hydrogen donor supplied. It will, therefore, be interesting to perform such experiments also at pH 7.6.

The manometric reading in an experiment in which thiosulphate and hydrogen have been supplied simultaneously, each of them in abundance, is *a priori* open to four possibilities. It may be 1) equal to the reading with thiosulphate alone, 2) equal to that with hydrogen alone, 3) between both readings, 4) above that with hydrogen alone \*).

The first possibility would indicate that thiosulphate had a much larger affinity than hydrogen to the system reacting with the hydrogen donors. In the reverse case the second possibility would be realised. The third case indicates that both donors have a comparable affinity to the system mentioned. Under these conditions we can learn something concerning these affinities from the magnitude of the reading. The fourth case can only occur, if there are specific catalysts for various donors or for various types of donor.

The results obtained have been collected in Table III. Both for high and for low light intensity the uptake of gas per hour found in the vessel containing both hydrogen donors lies between the uptakes for thiosulphate and hydrogen alone, so that the third possibility appears to be realised. It must be noticed that the gas that has disappeared from the gas phase is carbon dioxide in the vessel with thiosulphate alone, and a mixture of carbon dioxide and hydrogen in the other cases.

Fluorescence is about equal in all cases both at high and at low light intensities (fig. 33). There was no evidence that two hydrogen donors each present in abundance yielded a lower fluorescence than each of them separately. Or expressed in other words: when once a decrease is obtained by addition of an excess of a given hydrogen donor (e.g. hydrogen), addition of excess of another donor (e.g. thiosulphate) does not give any appreciable additional decrease. This conclusion must so far be restricted to the donors actually used and to the pH of 6.3, at which the decrease of fluorescence is of the same order of magnitude for hydrogen and for thiosulphate.

From the results obtained we may conclude that hydrogen and thiosulphate can replace each other at system I.

At high light intensities at pH 6.3, the rate of photosynthesis may be considered to be limited by the capacity of system I, as discussed in the preceding sections. In this case it is evident that the fractional occupation of system I with each of the two donors, simultaneously

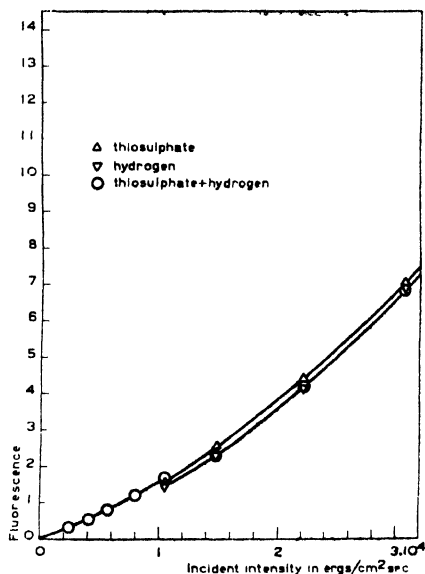


Fig. 33. Influence of the simultaneous presence of two hydrogen donors, each added in excess, upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.3, 29°). Exp. of 14.3.40.

\*) In principle a fifth possibility is conceivable, viz. that the reading in the presence of both donors would lie below the one with thiosulphate alone. This would imply that the hydrogen in this case would not be assimilated, and moreover would impede the assimilation of thiosulphate, which supposition is *a priori* very unlikely.



TABLE III.

Uptake of gas\*) in cmm/hour in the presence of hydrogen and/or thiosulphate  
ph 6.9, temp. 29°.

Date	Donors	Without dark correction		With dark correction		With dark correction and correction for uptake of CO <sub>2</sub> in the medium	
		high light intensity	low light intensity**)	high light intensity	low light intensity**)	high light intensity	low light intensity**)
13.3.40	thiosulphate H <sub>2</sub> thios. + H <sub>2</sub>	133	59				
		512	205				
		265	83				
14.3.40	thiosulphate H <sub>2</sub> thios. + H <sub>2</sub>	132	51	144	63		
		360	192	363	195		
		182	69	185	72		
18.3.40	thiosulphate H <sub>2</sub> thios. + H <sub>2</sub>	130	56	145	71		
		413	224	418	229		
		250	86	255	91		
20.3.40	thiosulphate H <sub>2</sub> thios. + H <sub>2</sub>	112 (122)	46 (57)	129 (139)	63 (74)	113	50
		325 (350)	126 (167)	331 (356)	132 (173)	331	132
		182 (202)	68 (90)	191 (211)	77 (100)	177	76
1.4.40	thiosulphate H <sub>2</sub> thios. + H <sub>2</sub>	121 (138)	42 (56)	135 (152)	56 (69)	127	54
		400 (422)	131 (181)	400 (422)	131 (181)	409	133
		227 (236)	68 (92)	230 (239)	71 (95)	224	70

\*) When only thiosulphate is present as a donor, the uptake of gas consists of carbon dioxide; in the other cases partly of carbon dioxide, partly of hydrogen.

\*\*) corrected for small differences in incident intensity in parallel vessels.

( ) values derived from half hour constant rate.

supplied, will determine the amounts of gas, *i.e.* carbon dioxide + hydrogen, taken up. The percentages of system I occupied either with thiosulphate or with hydrogen then are determined by the relative affinities, divided by the respective molecular reaction velocities.

At low light intensities, the rate of photosynthesis is limited by the number of quanta absorbed by the bacterio-chlorophyll per unit of time, and thus also by the number of quanta, transferred to the energy acceptor. Assuming that for refilling the transfer system with energy acceptor, no preference exists for the reaction products, formed at system I from either of the two donors, the percentages of the total number of quanta used in photosynthesis involved in the reaction either with products from thiosulphate or from hydrogen will be equal to the percentual occupation of the system I by both donors, which in this case is solely determined by their relative affinities to this system. Whilst, working with manometrically indifferent donors no direct influence of the donor on the gas uptake would be expected in the range of light limitation, the situation is different in our case, since the consumption of hydrogen is also detectable in the manometric reading. Due to this circumstance it is possible to compute the occupation of system I with each of the two donors also at low light intensities.

In order to calculate from the experimental data the percentages of system I occupied either with thiosulphate or with hydrogen, some further assumptions have to be made.

Firstly we assume that per unit amount of each donor, taken up in the „combined” experiment, the same amount of CO<sub>2</sub> is consumed as when each donor acts alone. In our opinion there is no plausible reason to suppose that this assumption is not valid.

Secondly the following, as such also very plausible assumptions have to be made. In the case

of high light intensity it has to be assumed that the molecular rate at which carbon dioxide is assimilated at the expense of one of the two donors is independent of the presence of the other one. Thus the active places at the enzyme-system I are engaged either in a reaction with one donor, or with the other one, and there is no interaction between the separate places. In the case of low light intensity we assume that the quantum efficiency of the assimilation of carbon dioxide at the expense of one of the two donors is independent of the presence of the other one.

Suppose now the vessel with thiosulphate assimilates per hour  $a$  cmm of  $\text{CO}_2$ , the vessel with hydrogen  $b$  cmm ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ ), the vessel with both donors  $c$  cmm ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ ). Then, for the case of high light intensity, a simple calculation enables to compute from the experimental data the percentage  $x$  of the system I occupied with thiosulphate and the percentage  $y$  occupied with hydrogen. We then have:

$$x + y = 100 \quad \dots \dots \dots (1)$$

and on the basis of the assumptions made

$$ax + by = 100c \quad \dots \dots \dots (2)$$

From (1) and (2)  $x$  and  $y$  can be solved:

$$x = 100 \frac{b-c}{b-a}; \quad y = 100 \frac{c-a}{b-a}$$

From (2) it is obvious that  $\frac{ax}{100}$  and  $\frac{by}{100}$  represent the parts of the total gas exchange  $c$  obtained at the expense of each donor. For this calculation not even the ratio between hydrogen and carbon dioxide assimilated needs to be known, it must only be supposed to be the same when hydrogen is present alone or together with thiosulphate.

For low light intensities the percentages of the limiting factor, *in casu* of the total number of quanta used in photosynthesis, can be computed in the same way. As expounded above the percentages thus found, also in this case represent the fractions of system I occupied with each of the two donors.

The percentages for hydrogen computed from the experiments from Table III are collected in Table IV. The data are presented in three series, *viz.* 1) without any correction, 2) with correction for dark metabolism 3) with correction for dark metabolism and for the chemical binding

TABLE IV.

Fraction  $y$  in % of system I occupied with hydrogen in the presence of hydrogen and thiosulphate  
ph 6.3, temp. 29°.

Date	Without dark correction		With dark correction		With dark correction and correction for chemical uptake of $\text{CO}_2$	
	high light intensity	low light intensity *)	high light intensity	low light intensity *)	high light intensity	low light intensity *)
13.3.40	35	16				
14.3.40	22	12	19	7		
18.3.40	42.5	18	40	13		
20.3.40	33 (35)	28 (30)	30 (33)	20 (26)	30	31
1.4.40	38 (35)	29 (29)	36 (32)	19 (23)	34	21
Average	34	21	31	15	32	26

\*) corrected for small differences in incident intensity in parallel vessels.

( ) values derived from half hour constant rate.

of  $\text{CO}_2$  to the sodium ions, remaining as a result of the conversion of thiosulphate (*cf.* (4)). With both donors, each present in abundance, in the region of light saturation about 32% of the system I appeared to be engaged in the reaction with hydrogen, and thus about 68% in the reaction with thiosulphate. The corrections introduced did not have much influence upon these percentages, as these corrections are small in relation to the gas exchanges measured. At low light intensity (about 1/5 of the high one, or  $0.6 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec.) the percentages found for hydrogen mostly were still lower than at high intensity. For the low light intensity the data show a greater scattering and the corrections for dark metabolism and chemical conversions cause larger changes, due to the relatively larger errors in the determination of low amounts.

From a combination of the values for  $x$  and  $y$  found at low and at high light intensities, the ratio of the reaction velocities of system I with each of the donors might be computed (*cf.* above). However, we consider our present data at low light intensity not sufficiently accurate to carry out this calculation.

We know from a large number of measurements that at light saturation under the conditions of these experiments (ph 6.3, temp 29° C.) the rate of photosynthesis expressed as uptake of  $\text{CO}_2$  is about the same with thiosulphate and with hydrogen. This means that the reaction velocities of both donors at system I do not differ much. Under these conditions the meaning of  $x$  and  $y$  becomes also: the percentages of the amount of  $\text{CO}_2$  reduced at the expense of thiosulphate and of hydrogen.

Before concluding this section we will still briefly discuss the conditions under which the 4th possibility mentioned above would hold, *viz.*, that the gas exchange obtained with both donors would surpass that with hydrogen alone.

The occurrence of possibility (4) for low light intensities would necessarily be connected with specific reactive spots at the system of energy transfer for the transfer of energy to the acceptors derived from various donors. This is only conceivable, if these energy acceptors differ for the various hydrogen donors. Besides this, for the realisation of (4) at low light intensities it is necessary that the energy absorbed by a given pigment molecule can only be transferred by one type of the specific reactive spots, in other words these spots should be specifically linked with the light absorption apparatus. In the reverse case, *i.e.*, when the energy could be distributed arbitrarily over either of the specific spots the gas uptake with both donors would lie between those with each donor separately.

For high light intensities, when system I limits the rate of photosynthesis, the occurrence of case (4) would indicate that separate specific spots exist at this system, because then in the case of two hydrogen donors the combined capacities would be available, allowing an increased total rate of energy transfer, and thus also of photosynthesis. These considerations have a bearing upon our previous work in which we have concluded to the existence of separate active complexes in the photosynthetic system of the bacteria (5)\*. In the present investigation, the bacteria used nearly always had the type of spectrum with both bands about equally well developed ((5), fig. 2a). It may be remarked that we consider the various maxima in the infrared as the indication of the existence of separate pigment-protein complexes (5); we may thus assume that both pigment-protein complexes were present in comparable amounts. In the region of visible light the absorption spectra of these complexes have not yet been studied thoroughly. As far as our experience goes, in strain D the absorption maximum in the region of the sodium lines, of interest here, is not much dependent on the type of infrared spectrum. Thus, the absorption in the region of the sodium lines may be considered to be about the same for each of the two symplexes.

We do not know whether the molar absorption coefficient of the pigment molecule is the same on different proteins; we will, however, suppose that it is not strongly different.

Now the experiments reported in this section have shown that the 4th possibility does not hold, neither at low nor at high light intensities. Hydrogen and thiosulphate replace each other, so that we cannot assume that each of the two symplexes answers to only one of these two donors, which belong to widely different chemical classes. Beforehand a direct connection between the symplexes and the hydrogen donors might be deemed improbable, since we have proved in the preceding sections that the hydrogen donor does not act as such in the energy transfer, but only *via* the intermediate of an enzyme. But it remains conceivable that system I were closely connected to the protein to which the pigment is bound.

\*) Recently FRENCH arrived at an analogous conclusion by the study of supersonic extracts from various strains of purple bacteria (25).

Whether the affinity of the energy acceptors, formed from both hydrogen donors, to each of the pigment-protein symplexes differs quantitatively for both symplexes, remains undecided by these experiments. It may even be conceived that in the case of both donors studied only one of the two pigment-protein complexes is active. This must be further studied with the aid of monochromatic radiation corresponding to the position of either of the infrared absorption maxima. So far we have not yet attacked this problem, and thus the physiological meaning of the two maxima remains to be elucidated.

The experiments reported form only a first approach to the study concerning the affinity of the enzyme-system I towards various donors. We consider experiments with combinations of hydrogen donors to be especially suited to give an insight into the comparative physiology of the various types of purple bacteria.

## § 12. On a possible relation between the gas exchange and the conversion of cellular hydrogen donors, with a remark on the quantum efficiency.

It was already mentioned in § 5 that the curve representing the rate of gas exchange against light intensity in purple sulphur bacteria does not start linearly from the origin, but shows an S-shape, indicating that the amount of gas exchange obtained for a given amount of light energy increases with increasing intensity. The same observation was made by FRENCH<sup>19)</sup> with *Athiorhodaceae*.

One may ask firstly whether the mentioned increase only holds for the rate of gas exchange, i.e. uptake of CO<sub>2</sub>, or also for the rate of photosynthesis. WOHL<sup>24)</sup> has suggested that the latter rate indeed increases, and ascribes the lower yield at low light intensities to the relatively greater importance of back reactions in intermediate steps of the process, and thus considers the S-shape to be related with the time interval between the transfer of successive quanta. As an argument in favour of this view he considers the fact observed by FRENCH<sup>19)</sup> that the yield at low light intensities decreases with increasing temperatures. The same tendency was observed in our experiments with *Chromatium*.

Although we have not yet examined the region of low light intensities in great detail, certain observations on gas exchange and fluorescence suggest that still another factor may be important for the development of S-shaped gas exchange curves, namely the cooperation of organic intra-cellular substances in the photosynthetic metabolism.

MULLER<sup>11)</sup> has shown that organic substances, especially fatty acids, can be converted photosynthetically into cell material by purple sulphur bacteria. This process may be considered to possess the character of an intramolecular oxydoreductive conversion, accompanied by either an uptake or an evolution of carbon dioxide, dependent on the degree of reduction of the substrate. Generally the observable gas exchange is smaller the more the substrate approaches the composition of the first product of photosynthesis. GAFFRON<sup>10)</sup> found that in *Athiorhodaceae* the assimilation of a molecule butyric acid is accompanied by the uptake of 1.40 mol. carbon dioxide. This means that for 5 carbon atoms assimilated only 1.40 mol. CO<sub>2</sub> is taken up from the gas phase. For various fatty acids GAFFRON found an uptake of about 0.5 mol. of CO<sub>2</sub> for each additional CH<sub>2</sub>-group. So for various substances of this class only about 1/3 of the number of C-atoms involved in photosynthesis is represented as uptake of carbon dioxide.

We may safely assume that in the case of intra-cellular donors the fraction of total photosynthesis measured as uptake of CO<sub>2</sub> will not be larger, probably smaller. On the other hand if CO<sub>2</sub> is converted with the aid of hydrogen or with thiosulphate, the total rate of photosynthesis is measured as uptake of CO<sub>2</sub>. These considerations allow in principle an explanation of the S-shape of the curve of gas exchange versus incident intensity, if the following further assumptions are made. At low light intensities the fraction of photosynthesis, running at the expense of intra-cellular donors must be larger than at high intensities. This is easily understood, if the intra-cellular donors have an affinity to the active systems comparable with that of the externally supplied donors, but moreover are supplied only at limited maximum rates. Then, at low light intensities, photosynthesis will run for an appreciable fraction at the expense of intra-cellular donors, accompanied only by a low uptake of carbon dioxide. With increasing intensity the

available amount of intra-cellular donors will soon become quite insufficient to occupy an appreciable part of the system reacting with the hydrogen donors, and the greater part of the total rate of photosynthesis will run at the expense of externally supplied hydrogen donors.

Further evidence regarding the S-shape of the gas exchange curve is given by the curve of fluorescence against incident intensity. This curve shows a linear course at low intensities, indicating that in the region of low intensities no anomalies in the transfer of energy occur. This is in accordance with the supposition that the S-shape of the gas exchange curve is due to the consumption of intra-cellular donors, but it does not definitely prove that this is the case. For the same thing would be observed when the peculiarities in the gas exchange were due to in special properties of the processes using the energy transferred (*cf.* Chapter V).

Some direct indications for the cooperation of small amounts of intra-cellular donors photosynthesis may now briefly be discussed.

1. When no hydrogen donors are supplied externally, the rate of gas uptake is very low, but the distinct evolution of gas which — although it is very small in phosphate buffers of pH 6.8 — is observed in the dark, is suppressed totally at high light intensities and at least partly at low ones. At high light intensities a small gas uptake is observed. It was already remarked elsewhere (18) that other authors report larger values of „auto-assimilation”, especially with respect to measurements of photosynthesis in bicarbonate solutions.

2. Another argument in favour of the participation of intra-cellular donors in photosynthesis may be derived from the curves of fluorescence against incident intensity in the absence of externally supplied hydrogen donors. These fluorescence curves start from the origin with the same slope as the curves with donor but they reach their final slope at a lower intensity. Since the transition point intensity is strongly susceptible to the supply of hydrogen donor it lies at hand to assume that in the part of the curve with the initial slope, photosynthesis runs at the expense of intra-cellular donors.

TABLE V.

Influence of starvation upon transition point intensities of fluorescence in donor-free suspensions, pH 6.3, temp. 29°.

Starved				Non-starved			
Date	Fluorescence transition point intensity in donor-free suspensions (in ergs/cm <sup>2</sup> sec.)	Donor	Rate of photosynthesis in cmm CO <sub>2</sub> p. hour at light saturation	Date	Fluorescence transition point intensity in donor-free suspensions (in ergs/cm <sup>2</sup> sec.)	Donor	Rate of photosynthesis in cmm CO <sub>2</sub> p. hour at light saturation
21. 9.39	$3.4 \times 10^3$	thiosulphate	173	4 12.39	$6.2 \times 10^3$	hydrogen	163
22. 9.39	$4.0 \times 10^3$	thiosulphate	127	8.12.39	$5.9 \times 10^3$	thiosulphate	236
27. 9.39	$5.0 \times 10^3$	—	—	11.12.39	$7.8 \times 10^3$	thiosulphate	208
3.10.39	$3.1 \times 10^3$	thiosulphate	136	12.12.39	$5.9 \times 10^3$	thiosulphate	248
4.10.39	$3.7 \times 10^3$	thiosulphate	123	18.12.39	$5.9 \times 10^3$	thiosulphate	178
5.10.39	$3.7 \times 10^3$	thiosulphate	104	30. 1.40	$2.8 \times 10^3$	hydrogen	191
5.10.39	$3.4 \times 10^3$	thiosulphate	135				
10.10.39	$3.4 \times 10^3$	hydrogen	122				
		thiosulphate	131				
21.10.39	$3.4 \times 10^3$	hydrogen	187				
Average	$3.7 \times 10^3$		137	Average	$5.9 \times 10^3$		204
Relative values	64		67		100		100

From Table V an argument in favour of this view may be derived. The transition point intensity of the donor-free curves appears to be lower for suspensions of starved cells than for those of non-starved cells. This is in agreement with the probably lower supply of cellular donors in the former cells. In Table V we have also collected the maximum rates of photosynthesis obtained with the same samples of cells in the presence of a suitable donor. It was already remarked before that the treatment of starvation results in a decrease of this maximum rate. Table V shows that this decrease is of the same order of magnitude as the decrease in the transition point intensity of fluorescence. This suggests that also the intra-cellular donors are not present in a form, directly available to the photosynthetic system but that their supply is controlled by an enzymatic system which is damaged by the starvation process to the same degree as the system controlling the maximal rate of photosynthesis in the presence of externally supplied hydrogen donors. This question has, however, not yet been further investigated.

In connection with this statement also the influence of temperature upon the S-shape may be understood from our conception. At low light intensities the rate of gas exchange is limited by a non-temperature-sensitive process. The supply of cellular donors, however, is probably controlled by a temperature-sensitive process. Therefore, at a given low light intensity at low temperature a smaller fraction of the total photosynthesis will run at the expense of intra-cellular donors, causing an increased gas-exchange and thus a decrease in S-shape.

The question now arises, whether the intensity range over which the S-shape is extended agrees with the intensity range at which in donor-free suspensions fluorescence shows the initial slope. Unfortunately we have recorded only in a few experiments gas exchange curves over a range of intensities together with donor-free fluorescence curves for the same cell material. Therefore we have collected all data available from the whole of our experimental material and treated the matter statistically.

We have introduced the intensity  $I_s$  (fig. 34), obtained by extrapolating the linear part of the curve of gas exchange against incident intensity to the abscis, and also the value  $AA'$  which represents the magnitude of the deficit in carbon dioxide taken up at a given intensity due to the reason(s) causing the S-shape of the curve. Although at present we are only interested in the value  $I_s$  we have included both values in table VI.

TABLE VI.

Values of  $I_s$  (in ergs/cm<sup>2</sup> sec.) and of  $AA'$  (in cmm CO<sub>2</sub>/hour) under various conditions. Temp. 29° (cf. also fig. 34).

Hydrogen donor	ph	$I_s$	$AA'$	Number of experiments averaged	Remarks
thiosulphate . . .	6.3	$1.1 \times 10^3$	13.5	6	starved
thiosulphate . . .	6.3	$1.2 \times 10^3$	16	14	non-starved
hydrogen . . . . .	6.3	$1.8 \times 10^3$	26	8	non-starved
hydrogen . . . . .	7.6	$2.0 \times 10^3$	24	7	non-starved
thiosulphate . . .	6.3	$5.5 \times 10^3$	41	5	partial inhibition with urethane.
hydrogen . . . . .	6.3	$8 \times 10^3$	40	1	partial inhibition wit NaN <sub>3</sub> .

The following conclusions may be drawn. With thiosulphate the intensity  $I_s$  (the extension of the S-shape) is somewhat smaller than with hydrogen. For hydrogen there is no distinct difference between its magnitude at ph 6.3 and 7.6. When both ph values were applied in the same experiment we found the S-region as a rule somewhat more extended at ph 7.6. A more important conclusion is that the intensity  $I_s$  — which is obtained in experiments with hydrogen donor added — is distinctly smaller than the transition point intensity of the fluorescence curve in donor-free sus-

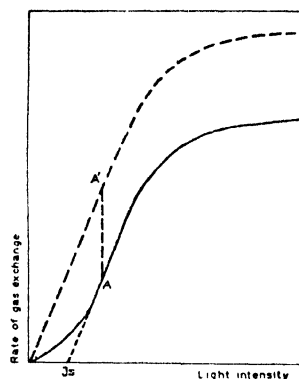


Fig. 34. Scheme showing  $I_s$  and  $AA'$  related to the S-shape of the curve representing the relation between the rate of gas exchange and the intensity of incident light (see text).

pensions (*cf.* Table V). If nevertheless both phenomena are fundamentally due to the same cause, we must assume that the contribution of intra-cellular donors to photosynthesis decreases as soon as other donors are available, which appears well conceivable.

The values AA' also represented in Table VI show analogous differences as the values  $I_s$ . Separately we have given the values  $I_s$  and AA' obtained with suspensions poisoned with sodium azide or with ethyl urethane. We will see lateron (§§ 17, 18) that the S-shape of the gas exchange curve is then strongly increased which is reflected in the much larger values obtained for  $I_s$  and AA'. Although it is tempting to interpret this as a preferent inhibition of photosynthesis upon externally supplied hydrogen donors above that of photosynthesis upon intra-cellular ones, we will see lateron that the fluorescence curves in these cases demonstrate that also other phenomena are in play.

Concluding, we may say that certain features of the curves of gas exchange and fluorescence are in accordance with the assumption that intra-cellular donors play an important part in photosynthesis at low light intensities. On the contrary the available evidence is not yet sufficient to consider this explanation as definitely preferent above other possibilities. A definite choice between the explanation of the S-shape suggested by WOHL<sup>24</sup>), and the one presented in this section, is not yet possible.

The particular shape of the gas exchange curve renders the determination of quantum efficiencies open to discussion. A purely empirical standpoint would suggest to determine the quantum efficiency at a given point from the slope of the line connecting this point with the origin; in this way it is derived from the amount of chemical work done by a given amount of light. But in this way a constant quantum number cannot be obtained over the whole range of intensities in an experiment, and thus the determination becomes quite arbitrary. FRENCH<sup>19</sup>) has decided to regard as the most reliable value the quantum efficiency resulting from the steepest part of the curve. If the tentative explanation of the S-shape of the curve, presented in this chapter, should be right, then the procedure of FRENCH would yield the efficiency of the process of photosynthesis with the externally supplied donor, and thus would indeed furnish the most rational answer to be obtained from the experiment.

In the scope of the present investigation we have not especially studied the quantum efficiency, nor laid special stress upon the highest efficiency obtainable. We are aware of the fact that our preceding contribution to this problem (4) has not yet sufficiently answered the question. No doubt there still remain various promising lines of attack, *e.g.*, an investigation of the influence of quality and quantity of light during the development of the cultures. In the present paper we have investigated the bacteria under the best conditions formerly established, but not attempted to acquire a new insight into the factors determining the quantum efficiency. The optimal activity observed was about the same as recorded formerly. However, because our observations now extend to a greater variety of conditions, *e.g.*, to  $H_2$  as a hydrogen donor, and furthermore to pH 7.6, we thought it worthwhile to collect in Table VII quantum efficiencies recorded in a number of experiments under various conditions.

The values lie within the same limits as those formerly obtained for good cultures of strain D, *viz.*, between 8 and 16 quanta per molecule of  $CO_2$  taken up. Apparently a distinct difference between the numbers obtained under various conditions as collected in the table, does not exist. The numbers obtained from the experiments with thiosulphate are not corrected for the extra chemical uptake of  $CO_2$  (4). As the values were obtained from gas uptakes of about 50–100 cmm, these quantum numbers will have to be increased with about 10%, owing to this correction (*cf.* (4)).

Note added after preparation of the manuscript.

Quite recently FRANCK and GAFFRON (*Advanc. in Enzymol.* 1, 203 [1941]) have suggested that the rather low efficiencies obtained in our previous investigation (4), were only apparent, since a considerable dark metabolism should be present, a remark GAFFRON made also some time ago (*Ann. Rev. Biochem.* 8, 495 [1939]). In phosphate buffers, as used in our experiments, the gas exchange in the dark is much smaller than in bicarbonate solution. Especially in dilute bacterial suspensions, as used in the present investigation it is very small and in most cases it is less than 10% of the rate of photosynthesis under light saturation. Therefore, we do not believe that auto-assimilation has interfered to a large extent with our measurements.

TABLE VII

Quantum numbers obtained from experiments under various conditions.

Date	Donor	ph	Temp.	Quantum number (quanta/mol. of CO <sub>2</sub> assimilated)	Average
23.6. '38	thiosulphate	6.3	29°	10.4	10.9*)
23.6. '38	"	"	"	12.4	
9.8. '38	"	"	"	10.8	
15.8. '38	"	"	"	11.3	
8.12. '39	"	"	"	9.3	
11.12. '39	"	"	"	13.8	
12.12. '39	"	"	"	11.3	
15.12. '39	"	"	"	11.0	
18.12. '39	"	"	"	9.8	
19.12. '39	"	"	"	9.8	
19.12. '39	"	"	"	11.8	
24.1. '40	"	"	"	8.5	
14.12. '39	thiosulphate	6.3	19°	12.8	—
24.11. '39	hydrogen	6.3	29°	12.8	11.4
1.12. '39	"	"	"	10.4	
30.1. '40	"	"	"	11.3	
31.1. '40	"	"	"	9.8	
21.5. '40	"	"	"	16.0	
28.5. '40	"	"	"	8.5	
29.5. '40	"	"	"	10.8	
21.5. '40	hydrogen	7.6	29°	15.4	12.6
28.5. '40	"	"	"	12.8	
5.6. '40	"	"	"	12.4	
13.6. '40	"	"	"	12.4	
19.6. '40	"	"	"	10.6	
10.7. '40	"	"	"	12.1	
10.7. '40	hydrogen	7.6	22°	12.1	—

\*) To be increased with about 10% (see text).

## Chapter V.

On agents influencing the rate of photosynthesis, either by their action upon the issue of the activated energy acceptor from the energy transfer system, or by competition with the normal energy acceptors.

## § 13. Introduction.

In this chapter we will report on the study of some agents which have a marked influence upon the rate of photosynthesis, but which are not specifically connected with the transfer of energy from bacterio-chlorophyll. This is expressed by the fact that their action upon fluorescence is much less pronounced than their influence upon gas exchange, and that both actions do not run parallelly. Examples of this type are, *e.g.*, limited supply of carbon dioxide and the action of certain specific poisons like hydroxyl amine and cyanide.



At very high concentrations these poisons exert still another influence, *viz.*, they appear to compete with the normal energy acceptor at the transfer system, and to be able to accept energy from bacterio-chlorophyll. This accepting capacity is much more pronounced in the

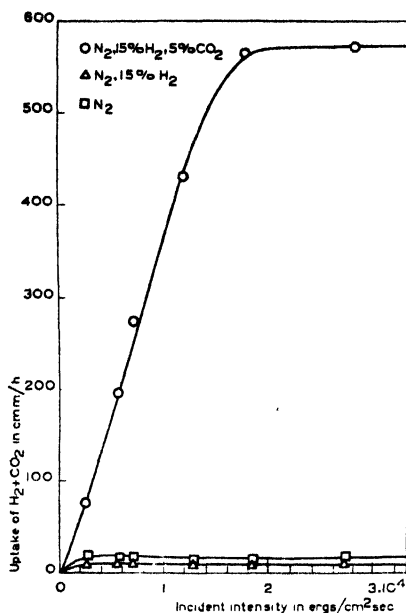


Fig. 35. Influence of CO<sub>2</sub> upon the rate of photosynthesis (H<sub>2</sub> 15%, ph 6.3, 29°). Exp. of 30.1.40.

reach a considerable value. So neither much CO<sub>2</sub> is produced, and thus we may expect that also the external supply of CO<sub>2</sub> is an important factor in the velocity of photosynthesis. Indeed, if CO<sub>2</sub> was omitted, only very low values of photosynthesis were observed, as may be seen from fig. 35.

When carbon dioxide is added in various increasing small amounts, the rate of photosynthesis is proportional to the amount supplied, as far as small amounts are concerned. Contrary to what has been observed with hydrogen, already at ca 400 mm CO<sub>2</sub> per vessel (= ca 2%) saturation becomes apparent (*cf.* fig. 36). This is probably chiefly due to the much larger solubility of carbon dioxide, so that already at a low pressure a rather considerable concentration is at the disposal of the bacteria in the solution. Furthermore it must be taken into account that the bacteria use 2 molecules of H<sub>2</sub> for 1 molecule of CO<sub>2</sub>. It may be mentioned that FRENCH<sup>19)</sup> found under the conditions of his experiments saturation with carbon dioxide at 4% external pressure.

Just as in the case of limited supply of hydrogen donor it lay at hand to ask in what way carbon dioxide limitation interferes with light limitation. Fig. 37 gives an experiment, which shows curves simultaneously determined at 8 light intensities each, for 5% carbon dioxide and for ca 1% carbon dioxide. The hydrogen donor was thiosulphate, ph 6.8, temp. 29°.

case of the general inhibitor urethane. Sodium azide behaved much like urethane, a fact that is perhaps somewhat remarkable. Hydroxyl amine and cyanide at the one hand, and azide and urethane at the other hand form in many respects two groups, though in some other properties there is a continuity in the sequence mentioned.

Also limited supply of carbon dioxide and addition of specific poisons like hydroxyl amine and cyanide do not leave fluorescence quite unaltered, but this influence may be considered as an indirect one, and caused by a decreased removal of activated energy-acceptor from the transfer system. The effect in question is due to a decreased rate of the process consuming the activated energy acceptor.

#### § 14. The influence of carbon dioxide.

a) The influence of carbon dioxide on gas exchange. It was already mentioned that the gas exchange was very small in the cases that no hydrogen donor was supplied. This proves that the cells do not contain or produce appreciable amounts of substances that are photochemically dehydrogenated under gas exchange. Other dehydrogenation processes also seem not to occur on a large scale in the bacteria under the conditions of our experiments, as the gas exchange in the dark does not

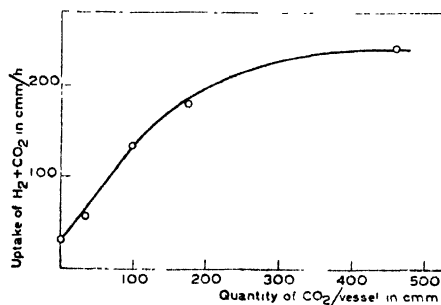


Fig. 36. Influence of CO<sub>2</sub> upon the rate of photosynthesis (H<sub>2</sub> 15%, ph 6.3, 29°, high light intensity). Exp. of 19.10.'39.

The curves are of the same type as those found for donor limitation; at low light intensities the influence is much less marked than at high ones. The influence of  $\text{CO}_2$ -limitation on fluorescence, however, will show that quite another mechanism is active than in the case of donor limitation.

b. The influence of carbon dioxide on fluorescence. In fig. 88 curves of fluorescence against incident intensity for suspensions without externally supplied hydrogen donor, with and without carbon dioxide, are presented. They are identical within the limits of experimental error.

In fig. 89 the influence of  $\text{CO}_2$  in the presence of thiosulphate at  $29^\circ$ , pH 6.8, in a suspension in which photosynthesis was totally inhibited by cyanide, is shown. Also here the fluorescence curve is the same with and without  $\text{CO}_2$ .

In fig. 40 fluorescence curves are compared for suspensions with thiosulphate at  $29^\circ$ , pH 6.8 with and without carbon dioxide. They are similar but not identical. For low intensities they coincide, for medium intensities the curve related to the case without  $\text{CO}_2$  runs higher, for high intensities it runs lower than the curve obtained with  $\text{CO}_2$ . In this figure the point of intersection of both curves lies within, sometimes it lies beyond the range of incident intensities applied. If various doses of carbon dioxide are applied, intermediate curves are recorded.

In fig. 41 the influence of addition of carbon dioxide is shown in the presence of hydrogen

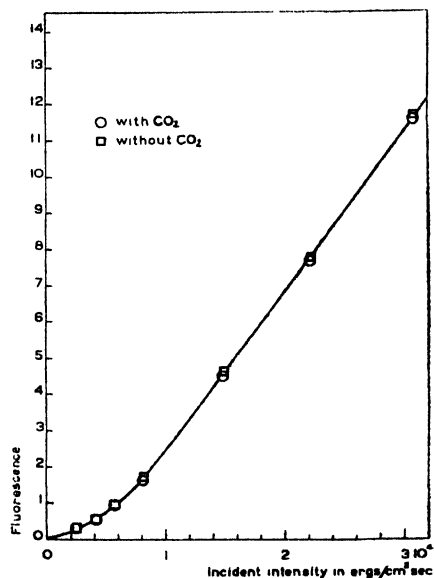


Fig. 88. Influence of  $\text{CO}_2$  upon the intensity of fluorescence in the absence of a hydrogen donor (pH 6.8,  $29^\circ$ ). Exp. of 18.12.'39.

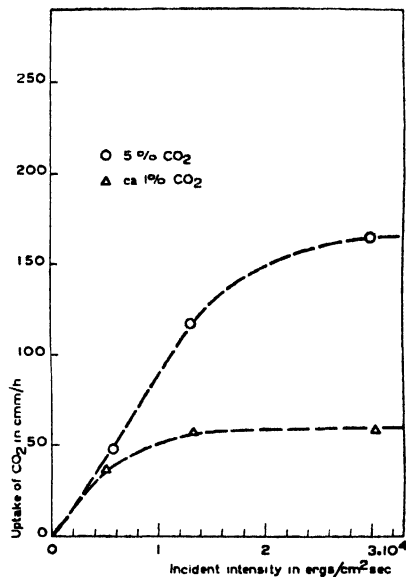


Fig. 37. Influence of  $\text{CO}_2$  upon the rate of photosynthesis (thiosulphate 1%, pH 6.8,  $29^\circ$ ) Exp. of 4.1.'40.

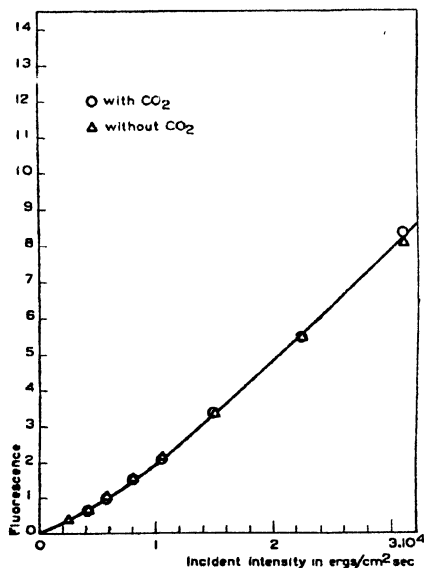


Fig. 89. Influence of  $\text{CO}_2$  upon the intensity of fluorescence in the presence of cyanide (thiosulphate 1%, pH 6.8,  $29^\circ$ , KCN 0.0167%) Exp. of 6.3.'40.

as a donor, at 29°, ph 6.3. The description given above of the curves obtained with thiosulphate also holds here.

From the experiments reported we may conclude that the influence of carbon dioxide upon fluorescence is of another type than the influences of hydrogen donor, temperature and ph.

c. Discussion. The influence of carbon dioxide on gas exchange manifests itself in the same way as the influences of the hydrogen donor, the temperature and the ph, discussed in Chapter IV. The influence upon fluorescence however indicates that another mechanism is active. The experiments with donor free suspensions with and without carbon dioxide (*cf.* fig. 38) lead to the conclusion that carbon dioxide as such has no influence upon the transfer of energy from bacterio-chlorophyll, contrary to what was shown for the hydrogen donors.

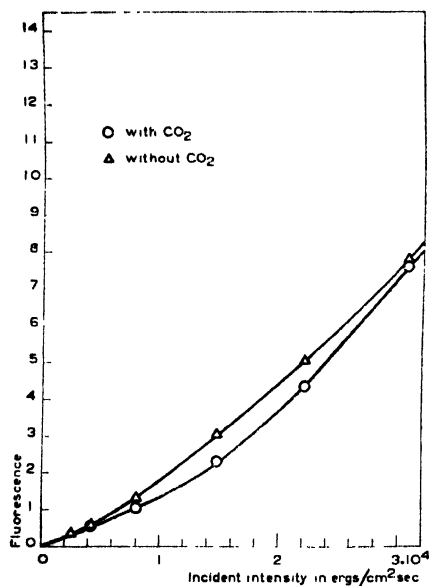


Fig. 40. Influence of  $\text{CO}_2$  upon the intensity of fluorescence (thiosulphate 1%, ph 6.3, 29°). Exp. of 18.12.'39.

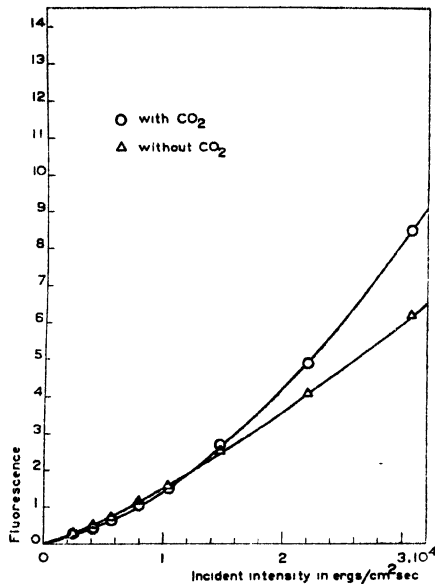


Fig. 41. Influence of  $\text{CO}_2$  upon the intensity of fluorescence ( $\text{H}_2$  15%, ph 6.3, 29°). Exp. of 30.1.'40.

The question arises which circumstance is then responsible for the difference in fluorescence curves observed in the presence of donor, with and without  $\text{CO}_2$ . We explain this with the aid of the difference in the rate of assimilation.

Hereto we must consider the occupation of the places of the transfer system. In principle these places are either empty, or occupied by the energy acceptor ready for acceptance, or by the energy acceptor which has not yet got rid of its previously accepted energy (activated acceptor). The ratio's of these three possible states determine the probability of energy transfer, hence the yield of fluorescence. Both many empty places, and many places occupied by activated energy acceptor give rise to a high fluorescence.

1) At low light intensities the capacity of the system of donor transformation is sufficient to avoid practically the occurrence of empty places at the transfer system. The number of places occupied by activated acceptor molecules is also very small both in the presence and in the absence of carbon dioxide. The condition herefor is that the next quantum will arrive into the same active complex long after the activated acceptor molecule has got rid of its energy of activation. The state of activation may be annihilated either by transfer of energy to the process of carbon dioxide assimilation, or in some other way, the latter requiring a longer time than the former. If the light intensity is low enough, the condition can be fulfilled also in the absence of carbon dioxide. The absence of empty places and of places occupied by activated acceptor both with and without carbon dioxide means

that at low light intensities the intensity of fluorescence is the same in both cases: limitation of the transfer process by the number of quanta absorbed.

2) At medium light intensities, the capacity of the system of donor transformation is still sufficient to prevent the occurrence of many empty places at the transfer system, both with and without  $\text{CO}_2$ . However, the number of activated acceptor molecules, present at the transfer system when the next quantum is absorbed in the same active complex, will increase with increasing intensity and will become of the same order of magnitude as the number of non-activated acceptor molecules \*). The increase of this number is much more pronounced in the absence of  $\text{CO}_2$  than in its presence, since in the former case the activated acceptor has a smaller probability per unit of time to lose its energy. Hence in the absence of  $\text{CO}_2$  there are more activated acceptor molecules present at the transfer system, and hence the number of places ready to accept energy from the bacterio-chlorophyll decreases. Thus the concentration of excited bacterio-chlorophyll, present in the stationary state of illumination, is increased, yielding also a higher intensity of fluorescence: limitation of the transfer process by the number of places ready to accept energy. This situation may be denoted as a coupling of the transfer system and the processes consuming carbon dioxide.

3) At high light intensities the capacity of the system of donor transformation will become a limiting factor. But, due to the consumption of more energy acceptor in the presence of  $\text{CO}_2$  than in its absence, in the former case the supply of hydrogen donor to the transfer system will become limiting for the energy transfer already at lower intensities.

We have to realize here that also when no appreciable photosynthesis proceeds, the hydrogen donor nevertheless comes into play (§ 8). However, VAN NIEL <sup>6)</sup> proved the stoichiometric relation between the consumption of hydrogen donor and the reduction of carbon dioxide, which for experiments of short duration also follows from the literature mentioned in (18), and from our experiments discussed there. We therefore have to assume that when  $\text{CO}_2$  is absent, the activated acceptor molecules at the transfer system „waste“ the energy received, and directly or after a short intermediate, will become reconverted into non-excited ones which again are ready to accept a quantum. So, in the absence of  $\text{CO}_2$ , more acceptor ready to accept energy, is present at the transfer system. Thus the supply of energy acceptor to the transfer system consists of two parts, namely one produced by the system reacting with the hydrogen donor, and one resulting from a simple sort of energy waste of the excited acceptor molecules. The second way becomes especially important in the absence of  $\text{CO}_2$  and then causes that the surface of transfer will have more places occupied by acceptor molecules which are ready to accept energy. Hence the concentration of excited bacterio-chlorophyll, present in the stationary state of illumination will be lower in the absence of  $\text{CO}_2$ . This means that at high light intensities fluorescence is lower in the absence of  $\text{CO}_2$ : limitation of the transfer process by the supply of energy acceptor.

A support for the conclusion that the influence of  $\text{CO}_2$  upon fluorescence is an indirect one, is furnished by the fact that with totally inhibited photosynthesis no influence of carbon dioxide is observed (fig. 39).

In § 8 the possibility was left open, that the reaction of limited capacity, leading to a decreased energy transfer was a reaction at the transfer system, following the acceptance of energy. Then, however, one cannot imagine, that the absence of  $\text{CO}_2$ , which also can only impede the issue of the reaction products from the transfer system, should cause a decrease of fluorescence at high light intensities. Hence the supposition of a limiting reaction at the transfer system, following the transfer of energy, is not consistent with the experimental data.

An important conclusion may still be drawn from the difference in influence of hydrogen donors and carbon dioxide upon fluorescence. We have seen that the addition of a hydrogen donor as such facilitates the transfer of energy, also when the process of photosynthesis is limited by lack of carbon dioxide (§ 8). On the other hand the addition of carbon dioxide does not influence the energy transfer directly. The effect of addition of carbon dioxide observed in the presence of a hydrogen donor reflects the linkage of the transfer system with dark systems not directly involved in the energy transfer. This on the other hand furnishes additional evidence for a conception including a transfer of energy, which is influenced by the supply of hydrogen donor. When namely also the effect of hydrogen donor upon fluorescence were merely due to the fact that it allows photosynthesis to proceed, it would not be observable when  $\text{CO}_2$  was absent. Besides

\*) This implies that the time, required to refill an empty place at the transfer system by an acceptor molecule is short as compared with the life time of activated acceptor molecules at the transfer system. It means that the acceptor molecules store their energy in some metastable form of potential energy, of much longer lifetime than occurring in common excitation (cf. also WOHL <sup>24)</sup>).

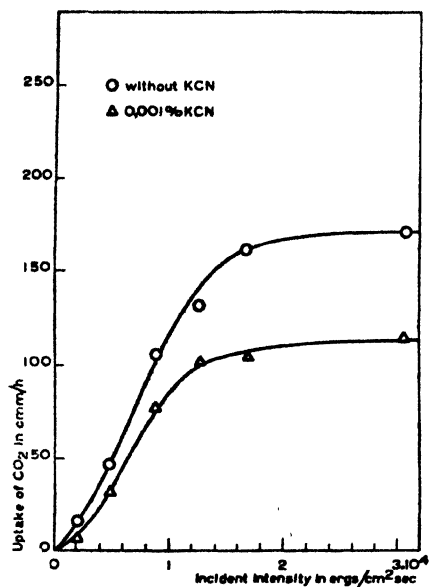


Fig. 42. Influence of cyanide upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, thio-sulphate 1%, ph 6.8, 29°). Exp. of 24.6.'38.

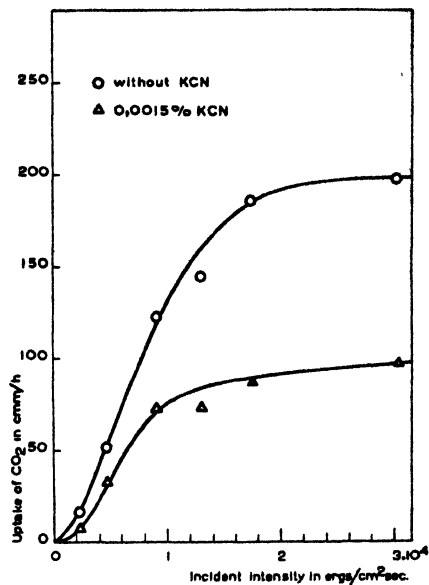


Fig. 43. Influence of cyanide upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, thio-sulphate 1%, ph 6.8, 29°). Exp. of 23.6.'38.

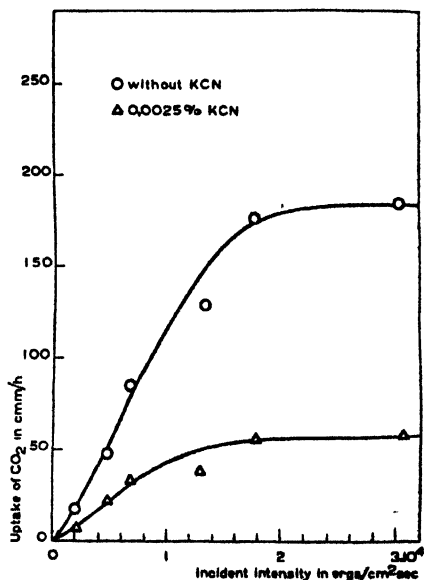


Fig. 44. Influence of cyanide upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, thio-sulphate 1%, ph 6.8, 29°). Exp. of 28.6.'38.

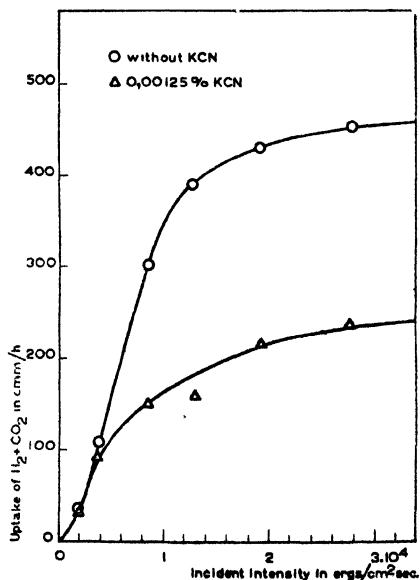


Fig. 45. Influence of cyanide upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub> 15%, ph 6.8, 29°). Exp. of 1.12.'39.

this, the addition of donor in the presence of  $\text{CO}_2$  would have the same effect as the addition of  $\text{CO}_2$  in the presence of donor, which is contrary to the experience. Therefore, as was already preliminarily remarked in § 8, the influence of the hydrogen donor upon fluorescence cannot merely be explained by a coupling between the energy transfer from bacterio-chlorophyll and subsequent dark processes, an explanation which was indicated with respect to the influence of  $\text{CO}_2$ .

### § 15. The influence of potassium cyanide.

a. The influence of KCN on gas exchange. As is known, WARBURG found the sensitivity of photosynthesis to KCN to be a property of the BLACKMAN-reaction, since photosynthesis at low light intensities was insensitive to cyanide, whereas at high intensities it was strongly sensitive.

Contrary to the situation in green plants, in which the influence of cyanide is well known, not much is known regarding its action upon photosynthesis of purple sulphur bacteria. GAFFRON<sup>9)</sup> has published some observations on this matter; however, he met with complications, presumably owing to reactions between sulphur compounds and cyanide. Under the conditions of our experiments no special difficulties were encountered in the study of the influence of cyanide.

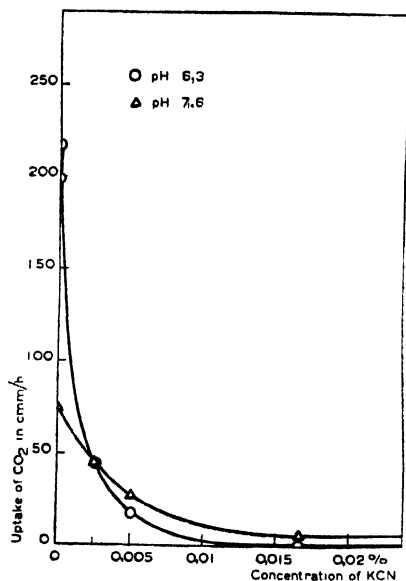


Fig. 46. Influence of cyanide upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, thio-sulphate 1%, 29°, high light intensity). Exp. of 7.5.40.

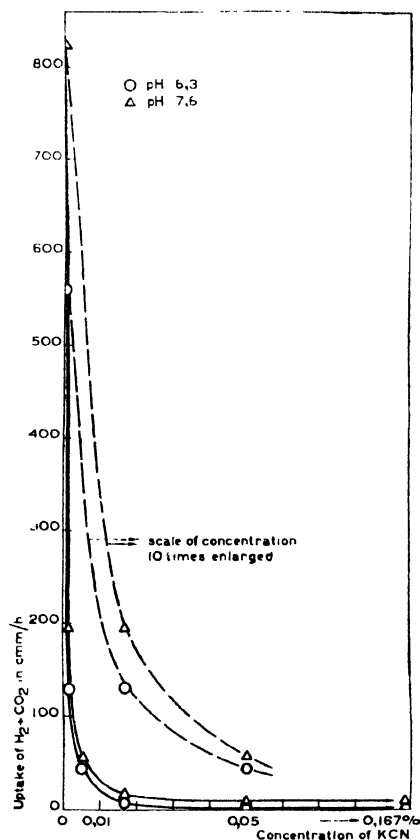


Fig. 47. Influence of cyanide upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  30%, 29°, high light intensity). Exp. of 27.6.40.

The sensitivity to KCN in relation to light intensity was generally found of the same type as in *Chlorella*. (figs. 42—45). However, especially with thio-sulphate as a hydrogen donor a decrease in rate was always observable also at low light intensities (figs. 42—44); with hydrogen the inhibition at low light intensities was found to be very small (fig. 45).

The relation between inhibition and cyanide concentration at high light intensities (figs. 46, 47) was of the same type in the presence of these two donors, a steep decrease occurs

already with very small concentrations (ca 0.005% KCN), whereas at ca 0.0167% photosynthesis is totally inhibited. The curves indicate that there is no concentration range in which no inhibition occurs. Especially with thiosulphate there is a marked difference between the inhibition at pH 6.8 and at pH 7.6. At pH 7.6 the curve runs much smoother. Perhaps this is connected with the fact that the system reacting with the hydrogen donor shows a reduced activity towards thiosulphate at this pH (§ 10). On the other hand one might be inclined to connect it with the reduced concentration of free HCN at higher pH. This explanation however is contradicted by the observation that the inhibition of photosynthesis with hydrogen as a donor shows the same relation to cyanide concentration at pH 6.8 and 7.6.

Moreover the often stated assumption that cyanide chiefly works in the form of HCN is in our opinion not strictly proved, at least not in the case of photosynthesis, just as there is evidence that the carbon dioxide available from a buffer solution is not restricted to the free acid (EMERSON and GREEN 20)).

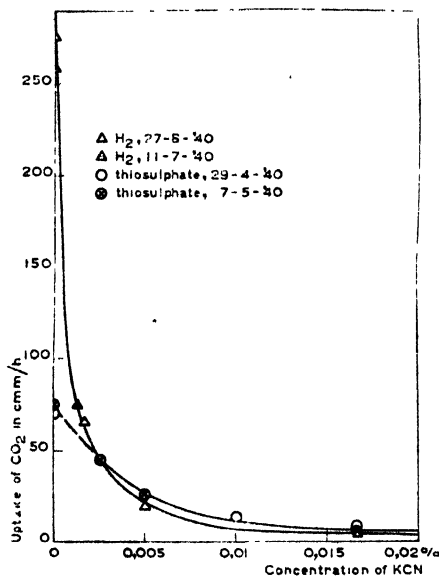


Fig. 48. Comparison of the influence of cyanide upon the rate of photosynthesis in presence of hydrogen with that in presence of thiosulphate at pH 7.6 (CO<sub>2</sub> 5%, 29°, high light intensity). Exps. of various dates.

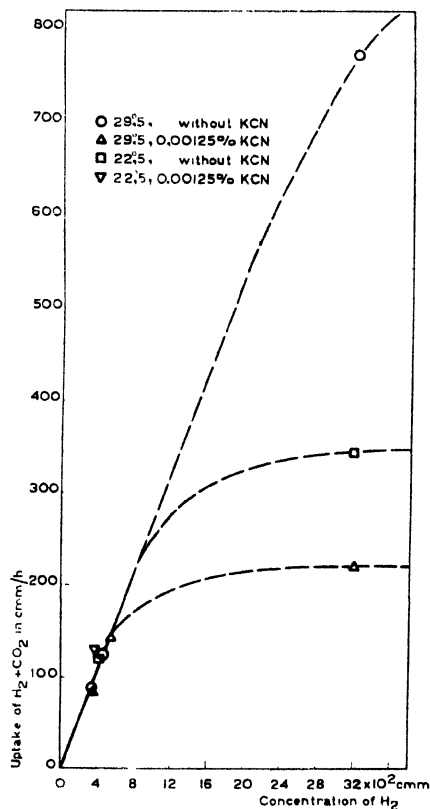


Fig. 49. Influence of cyanide upon the rate of photosynthesis at various concentrations of hydrogen donor and at different temperatures (CO<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub>, pH 7.6, high light intensity). Exp. of 11.7.40.

In fig. 48 data of several experiments at pH 7.6 have been collected. They suggest that at doses of KCN higher than ca 0.001% the rate of gas exchange is only dependent on the KCN-concentration and independent of the donor.

Fig. 49 represents an experiment, showing at the same time donor, temperature and cyanide influences. The curve (○) represents the rate of photosynthesis at 29.5° with 8 different hydrogen concentrations; the highest one is 15%, equal to about 3000 cm<sup>3</sup> per vessel. In this experiment this concentration still lies more or less in the range of donor limitation. The curve (□) shows the temperature influence for two of the concentrations; it is very marked only in the case of the high one. With the low concentration so little „substrate” (donor) is supplied to the enzyme reacting with it that this amount of substrate can fully be converted by the enzyme capacity

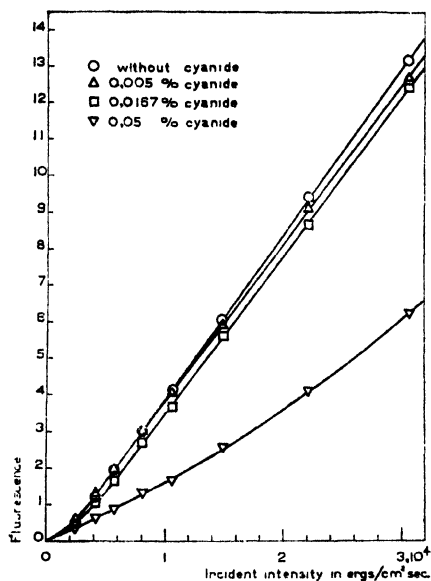


Fig. 50. Influence of cyanide upon the intensity of fluorescence in absence of a hydrogen donor ( $\text{CO}_2$  5%, ph 6.3,  $29^\circ$ ). Exp. of 10.7.'40.

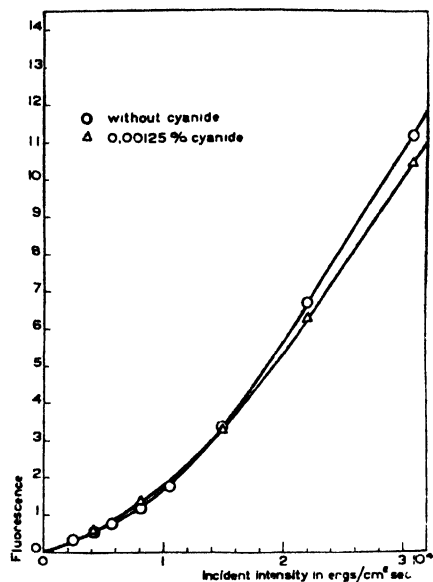


Fig. 51. Influence of cyanide upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, ph 6.3,  $29^\circ$ ). Exp. of 4.12.'39.

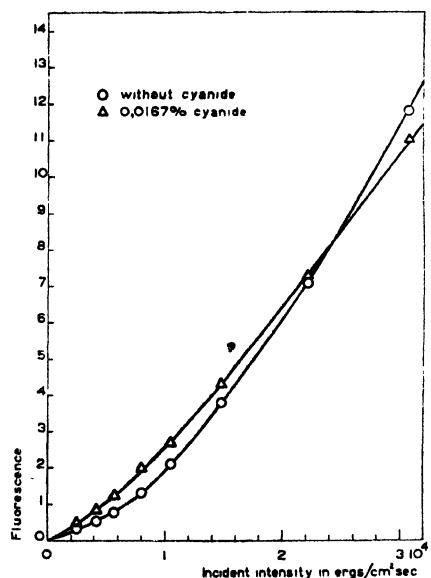


Fig. 52. Influence of cyanide upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, thio-sulphate 1%, ph 6.3,  $29^\circ$ ). Exp. of 4.3.'40.

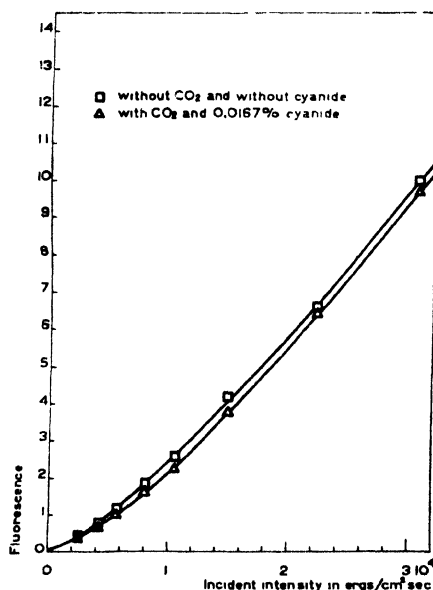


Fig. 53. Combined influence of carbon dioxide and cyanide upon the intensity of fluorescence (thiosulphate 1%, ph 6.3,  $29^\circ$ ). Exp. of 5.3.'40.



at the low temperature. The suspensions in equilibrium with a low external hydrogen pressure are not sensitive to KCN, neither at 29.5° ( $\Delta$ ) not even at 22.5° ( $\nabla$ ), indicating that the supply of hydrogen to the cells still limits the rate of photosynthesis. For the high concentration of hydrogen we have no data in presence of KCN at 22.5°.

b. The influence of KCN on fluorescence. The influence of KCN in various amounts upon the curves of fluorescence against incident intensity is rather complicated and dependent upon pH, presence of CO<sub>2</sub>, hydrogen donor and other factors.

A simple behaviour is observed when no donor is supplied (fig. 50). In this case the curves are hardly influenced by KCN up to a dosis of ca 0.0167%. For still higher doses of KCN we notice that the curves become straighter and that fluorescence for high light intensities is strongly decreased.

In the presence of hydrogen donor the effect of KCN resembles much the effect produced by omission of carbon dioxide: in first instance it is again due to the inhibition of dark systems not directly connected with the energy transfer. This can be illustrated by figs 51 and 52 showing the influence of KCN in doses causing partial and just total inhibition of gas exchange. The same features are observed as when CO<sub>2</sub> is omitted (*cf.* figs. 40, 41).

If indeed the two curves differ merely due to the fact that photosynthesis proceeds, one will expect that the curves for a suspension containing no carbon dioxide and no cyanide, and those for a suspension containing carbon dioxide and a suitable amount of cyanide will be the same, as is actually seen in fig. 53.

Series including also higher concentrations of cyanide are represented in figs 54—57. Figs 54 and 55 deal with the influence of various concentrations of cyanide in the presence of thiosulphate as a donor, at pH 6.8 and 7.6; in figs 56 and 57 the same is shown with hydrogen as a donor. In both cases all concentrations of cyanide have the tendency to give straighter curves than without cyanide; the values for high light intensities are decreased. At low concentrations of cyanide the initial slope is hardly changed; at high concentrations it is changed appreciably (*cf.* also figs 51 and 52).

c. Discussion. The influence of cyanide upon gas exchange is much the same as that in green plant cells; the effect is comprehensible on the assumption that cyanide chiefly acts upon a dark process.

The fluorescence measurements in suspensions without hydrogen donor have shown that concentrations of cyanide up to 0.0167% do not influence the transfer of energy from the bacterio-chlorophyll. The last mentioned concentration causes about total inhibition of photosynthesis.

In the presence of a hydrogen donor and of carbon dioxide, so when photosynthesis can proceed, these concentrations cause a decrease of fluorescence at high intensities. We explain this in the same way as in the case of a limited supply of carbon dioxide (§ 14), *viz.*, by assuming that, due to inhibition of the reaction of the activated acceptor with CO<sub>2</sub> by the poison, the transfer system becomes „empty” only at a higher light intensity than with non-inhibited reactions. For, if cyanide inhibited in first instance the system, reacting with the hydrogen donor, fluorescence would increase.

Concentrations of cyanide above 0.0167% influence fluorescence in the absence of a hydrogen donor in a way similar to the action of a hydrogen donor itself. We have to assume here that indeed cyanide in high concentrations occupies the surface of the transfer system and accepts energy itself, as we will also see for a number of other poisons. This view is supported by the fact that the fluorescence curve in the presence of a hydrogen donor is strongly straightened by high cyanide concentrations. The initial slope is as a rule increased, showing that the accepting capacity of cyanide is lower than that of the donor present. This also explains the at first sight somewhat strange sequence of the curves: from concentration zero upwards, the curves lie lower due to the influence of the inhibition of photosynthesis; beyond a certain concentration they begin to rise again because the „better” energy acceptor, derived from the donor, begins to undergo appreciable competition from the „worse” energy acceptor KCN. At still higher concentrations of KCN a small decrease of fluorescence is sometimes again observed, which we cannot explain. Of course, it is quite possible that for high concentrations of

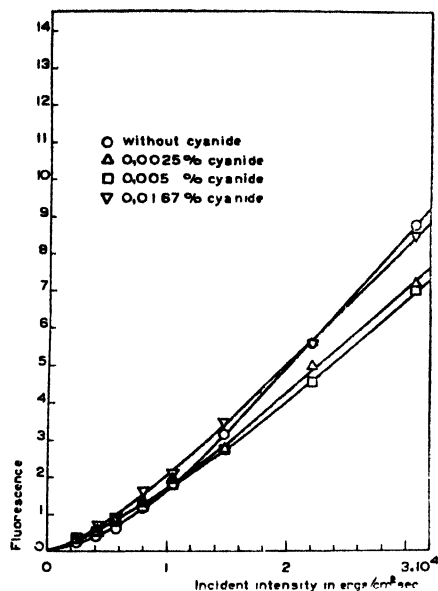


Fig. 54. Influence of cyanide upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, thio-sulphate 1%, ph 6.3, 29°). Exp. of 7.5.'40.

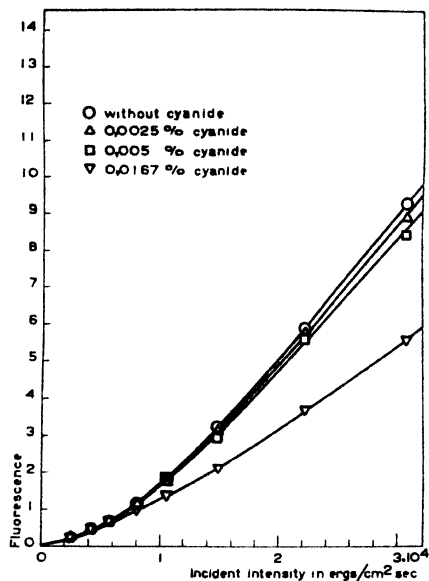


Fig. 55. Influence of cyanide upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, thio-sulphate 1%, ph 7.6, 29°). Exp. of 7.5.'40.

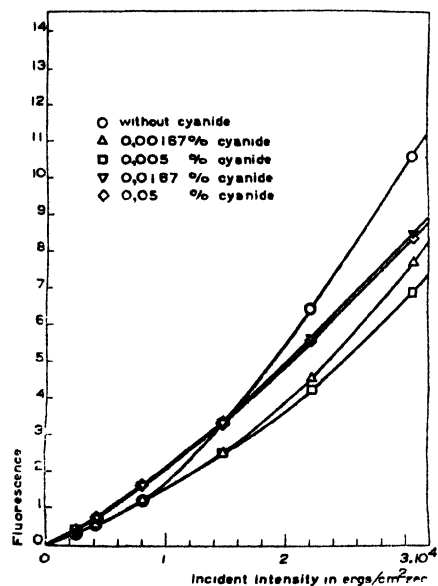


Fig. 56. Influence of cyanide upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  30%, ph 6.3, 29°). Exp. of 27.6.'40.

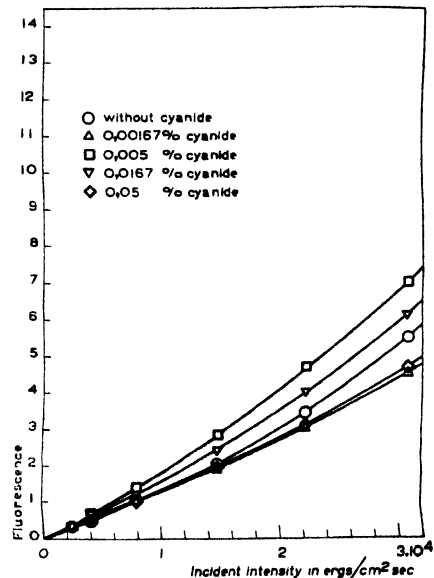


Fig. 57. Influence of cyanide upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  30%, ph 7.6, 29°). Exp. of 27.6.'40.

cyanide finally also the system transforming the hydrogen donor will gradually become inhibited.

As already remarked, the observations on fluorescence suggest that the sensitivity to cyanide must in the first place be sought in a system different from that, reacting with the hydrogen donors. In §§ 8—10 it was mentioned that the latter system may well be considered to be responsible for light saturation under various conditions. In these cases it is unexpected that low concentrations of cyanide already show a distinct inhibition of the maximum rate of photosynthesis. If cyanide acts upon another enzyme-system, not limiting in the normal cases, it would be expected that certain low doses did not show an observable inhibition. The same situation was also found with other inhibitors *e.g.* hydroxyl amine (*cf.* § 16).

The situation points to the conclusion that the capacities of the donor transforming and the cyanide sensitive system as a rule are of nearly the same magnitude. However, under different conditions appreciable shifts between the relative capacities of the two systems may take place. At pH 7.6 with hydrogen as a donor the rate of photosynthesis is very much affected by low concentrations of cyanide, whereas with thiosulphate as a donor the sensitivity to low concentrations of cyanide is much smaller (*fig.* 48). For higher concentrations of cyanide the remaining rate of photosynthesis is much the same in both cases. Along the line of thought followed this suggests that at pH 7.6 in the presence of hydrogen the cyanide-sensitive system is the most important limiting factor at high light intensities, whereas in the presence of thiosulphate the same holds for the donor transforming system. At pH 6.8 an intermediate position between these extremes seems to occur in the presence of both donors.

If one does not wish to accept this argumentation one may also look for an explanation for the observations by considering the back reactions in the course of the process. An appreciable fraction of the absorbed energy is annihilated (*cf.* § 12). We will assume that the activated acceptor, to be symbolized by „H” (*cf.* also § 26), can react either with a system bearing  $\text{CO}_2$ , or undergo a back reaction. The relative amounts of „H” going into the one or into the other direction will be determined by the „affinities” at both sides. The number of back reactions is dependent on the concentration of the relatively oxidized remainder of the acceptor, to be symbolized by „OH”, and of „H”, that of reactions with the  $\text{CO}_2$ -complex may be connected with its number of free places. This picture would allow to understand that at low light intensities no appreciable loss of energy occurs owing to back reactions, whereas partial inhibition of the  $\text{CO}_2$ -system, though not limiting in the ordinary sense, might decrease the chance for „H” to react with this system, and thus increase the number of back reactions, an effect which will be observed as an inhibition of the rate of photosynthesis.

It may be remarked in this connection that GAFFRON 27, 27a) has presented evidence for the occurrence of oxidative back reactions in photosynthesis of green organisms. Such reactions have been postulated to occur on a large scale in theoretical considerations regarding the general mechanism of photosynthesis by FRANCK and HERZFELD 28). In our opinion in the last mentioned considerations the importance of these phenomena has, however, been largely overestimated.

It may be asked whether the two systems or enzymes reacting respectively with the hydrogen donors and with  $\text{CO}_2$ , may not better be considered as a tightly linked complex, responsible for both reactions. However, in our opinion the described behaviour of the fluorescence is so characteristic that one cannot escape the conclusion that two different types of „BLACKMAN-effects” have to be distinguished, existing separately at each others side.

## § 16. The influence of hydroxyl amine.

a. The influence of hydroxyl amine \*) on gas exchange. As nothing was known regarding the concentration range to be applied, in the first place experiments were performed to establish a range of suitable concentrations. At each concentration fluorescence was measured in a range of intensities. In the measurements on gas exchange, however, only one high light intensity was applied to each vessel. From *figs* 58—60 it is seen that both with thiosulphate and with hydrogen at pH 6.8 and at pH 7.6 the range of partial inhibitions extends from 0 to ca 0.5%. Just as with cyanide, already the smallest applicable doses show an appreciable inhibi-

\*) Hydroxyl amine was used as its hydrochloric salt,  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ . The concentrations mentioned are calculated on the basis of this salt.

tion; the form of the curve gives no indication for the existence of a concentration range not yet causing inhibition.

Fig. 61 represents an experiment in which the influence of a concentration of hydroxyl amine, giving ca. 50% inhibition at our highest light intensity, was also studied at lower intensities, parallelly with non-inhibited samples. The curve has a pronounced BLACKMAN-type, with hardly any inhibition at low light intensities. So the action of hydroxyl amine appears still more selective for the non-photoc reactions than the action of KCN. A drawback of working with hydroxyl amine, however, was the considerable increase of inhibition with time, mostly observed; apparently the cells do not stand well the hydroxyl amine.

b. The influence of hydroxyl amine on fluorescence. Fig. 62 shows that in the absence of a hydrogen donor, up to concentrations of 0.5% hardly any influence upon fluorescence

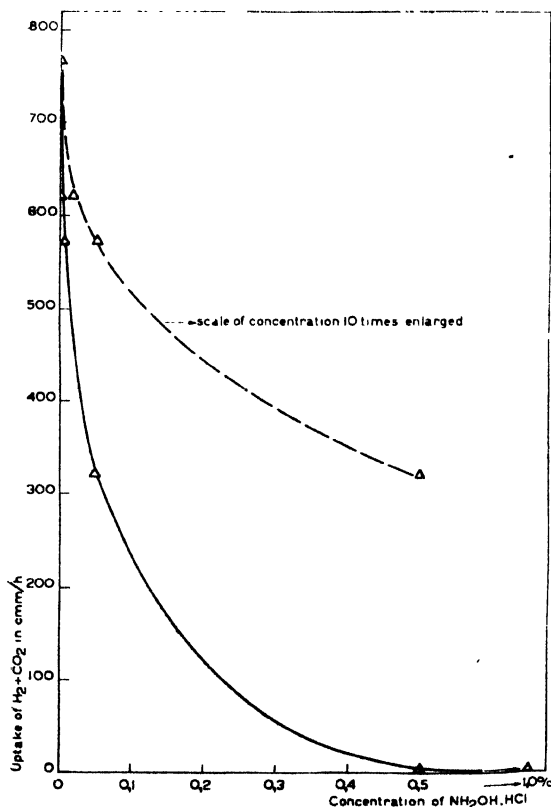


Fig. 59. Influence of hydroxyl amine upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6, 29°, high light intensity). Exp. of 4.6. '40.

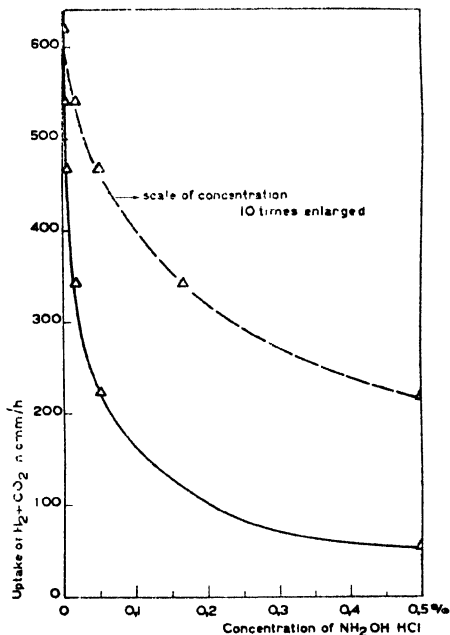


Fig. 58. Influence of hydroxyl amine upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 6.3, 29°, high light intensity, Exp. of 4.6. '40.

s observed. The experiment was performed at 29° and pH 6.3.

Fig. 63 shows the influence of hydroxyl amine in the presence of hydrogen at 29°, pH 6.3. In concentrations up to 0.05% only a small influence is observed; just as with cyanide it consists in a certain straightening of the curves, yielding higher values at medium light intensities, lower ones at high intensities. For higher concentrations the whole curve of fluorescence against incident intensity lies higher, which is especially marked at the highest concentration used, viz., 0.5%. The difference with the behaviour observed in the suspension without donor is obvious.

Fig. 64 shows the same experiment at pH 7.6. No essential differences between this set of curves and that at pH 6.3 are present. A still higher concentration, viz., 1% is applied, yielding a still higher course of the curve.

Finally in Fig. 65 we present the fluorescence observed in the experiment, the gas exchange of which has been represented in Fig. 61. The inhibition of ca. 60%

observed in the gas exchange at the highest intensity causes hardly any change in fluorescence.

c. Discussion. The observations reported show that just as cyanide and carbon dioxide, hydroxylamine influences gas exchange and fluorescence differently. At high light intensity in the presence of a hydrogen donor the rate of gas exchange continually decreases with increasing concentration of the poison: the fluorescence at first slightly decreases, then increases.

The observations on fluorescence in the donor-free suspension show that the poison, at least in the concentrations applied, does not directly interfere with the energy transfer.

In the behaviour of fluores-

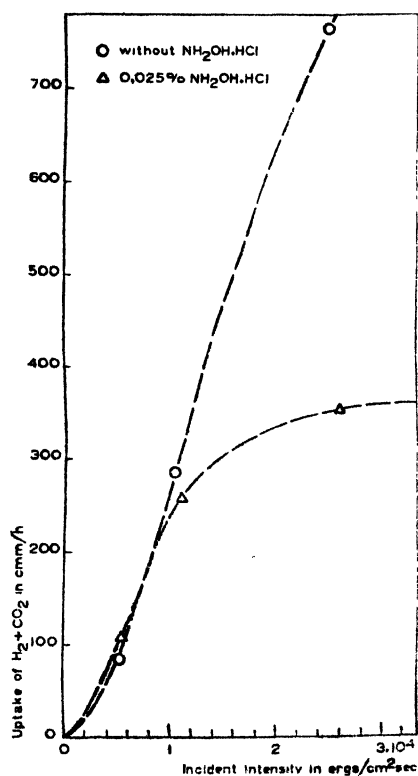


Fig. 61. Influence of hydroxylamine upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6,  $29^\circ$ ). Exp. of 5.6.'40.

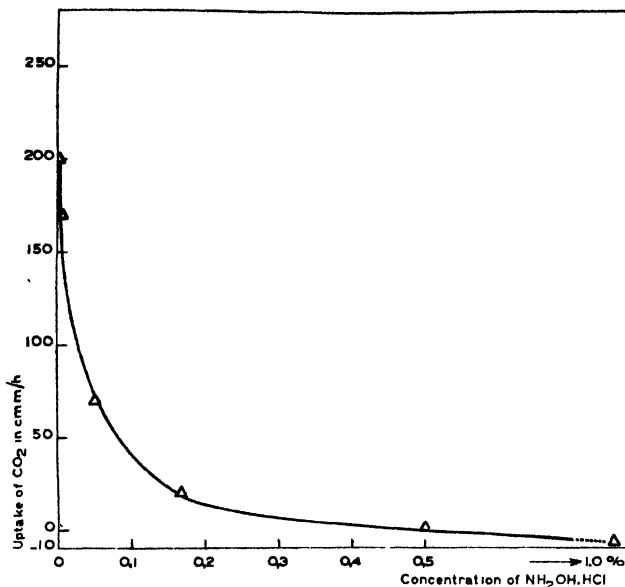


Fig. 60. Influence of hydroxylamine upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, thiosulphate 1%, pH 6.8,  $29^\circ$ , high light intensity). Exp. of 6.6.'40.

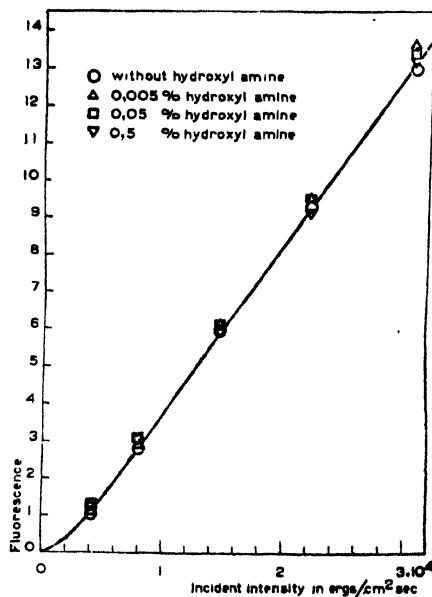


Fig. 62. Influence of hydroxylamine upon the intensity of fluorescence in the absence of a hydrogen donor ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.8,  $29^\circ$ ). Exp. of 6.6.'40.

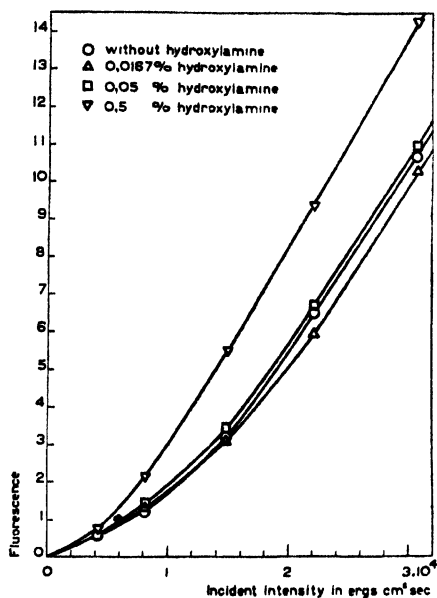


Fig. 63. Influence of hydroxylamine upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 6.3,  $29^\circ$ ). Exp. of 4.6.'40.

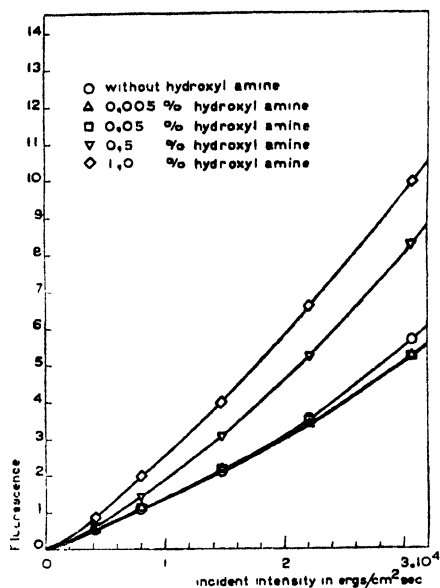


Fig. 64. Influence of hydroxylamine upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6,  $29^\circ$ ). Exp. of 4.6.'40

cence in the presence of a hydrogen donor apparently at least two types of influences are reflected. The changes in fluorescence at low concentrations are only slight, and, as in the case of cyanide they are the result of the indirect influence upon the energy transfer, caused by inhibition of the system, active in the reduction of carbon dioxide. The relative constancy of fluorescence in connection with the appreciable inhibition of gas exchange, shows that hydroxylamine does not primarily inhibit the dark system supplying the transfer system with energy acceptor.

In the appreciable increase of fluorescence at higher concentrations another influence becomes evident. This effect just becomes visible at ca. 0.05% of hydroxylamine with hydrogen at pH 6.3,  $29^\circ$  (fig. 63); at this concentration the gas exchange is already inhibited for 60% (fig. 58, same experiment). This proves that the influence under discussion is not the primary cause of the inhibition of gas exchange.

In further analogy with cyanide, one is inclined to assume a direct influence of the hydroxylamine upon the transfer system, which leads to an impeded energy transfer owing to a competition between the poison and the normal energy acceptor. On the other hand, however, the influence of high concentrations of hydroxylamine upon fluorescence may be explained just as well by assuming that hydroxylamine then inhibits the system, transforming the hydrogen donor into energy acceptor.

A comparison of figs 62 and 63 shows that in the presence of hydrogen the fluorescence curve is markedly raised by 0.5% hydroxylamine, indicating that the transfer of energy is impeded. In the absence of a hydrogen donor the curve is hardly changed by 0.5% hydroxylamine.

These phenomena can be explained along both ways suggested above. The similarity in effect of hydroxylamine and of cyanide, observed in other respects, speaks in favour of the first explanation. Fig. 62 would then suggest that the energy accepting capacity of hydroxylamine is about the same as

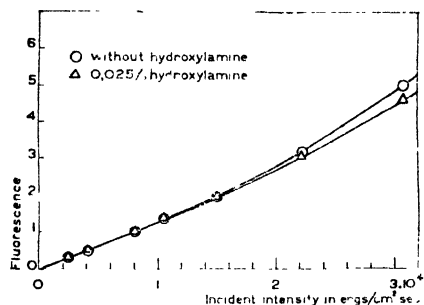


Fig. 65. Influence of hydroxylamine upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6,  $29^\circ$ ). Exp. of 5.6.'40.

that of the donor free transfer system. On the other hand the shape of the inhibition curves for fluorescence, especially as shown in fig. 68, also renders the second explanation well acceptable.

It seems reasonable to suppose that in this case, as well as for other poisons in high concentrations, the actual behaviour of fluorescence is determined by a cooperation of influences exerted on various systems involved in the process of photosynthesis. A classification of different poisons is only possible according to their influence in low concentrations on gas exchange and fluorescence. It is evident that on this basis hydroxyl amine and cyanide belong to the same group.

### § 17. The influence of sodium azide.

a. The influence of sodium azide upon gas exchange. Figs 66 and 67 show the range of concentrations of sodium azide, causing partial inhibition in the presence of hydrogen at pH 6.8 and pH 7.6. At pH 6.8 the inhibition curve appears to be somewhat steeper than at pH 7.6 but the difference is not very large. Above ca 0.167%  $\text{NaN}_3$ , photosynthesis is totally inhibited. Fig. 68a shows an experiment in which some

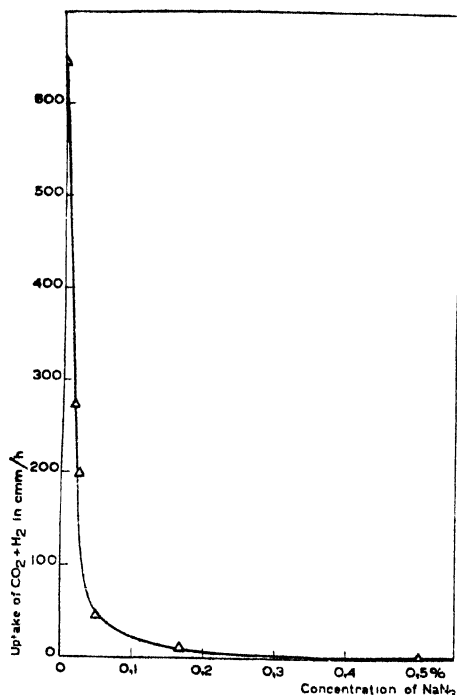


Fig. 66. Influence of sodium azide upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 6.8, 29°, high light intensity). Exp. of 29.5.40.

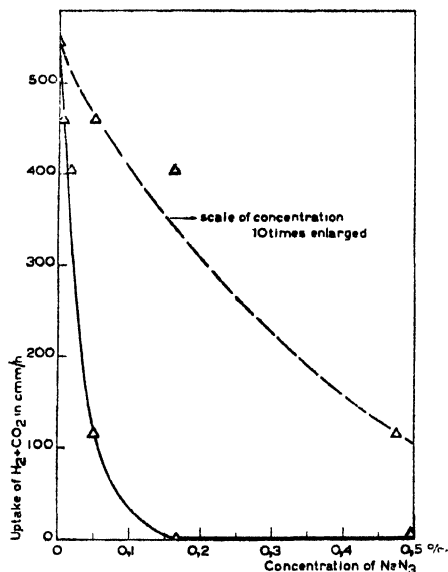


Fig. 67. Influence of sodium azide upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6, 29°, high light intensity). Exp. of 30.5.40.

more observations have been made in the region of low concentrations. As the highest intensity available was not equal for all vessels, a correction on the basis of the curve representing the non-inhibited photosynthesis against light intensity (fig. 68) has been applied.

Fig. 69 shows the inhibition curve in the presence of thiosulphate at pH 6.8. Under these conditions the cells proved to be much more sensitive to azide; already 0.025% caused total inhibition.

Fig. 70 shows an experiment (hydrogen, 29°, pH 6.8) in which the influence of a concentration of azide, causing about 50% inhibition at the highest light intensity, was examined also at lower intensities, in comparison with the non-inhibited photosynthesis. The influence is much different from that observed with cyanide and with hydroxyl amine. Whereas these compounds, especially hydroxyl amine, caused hardly any inhibition at low light intensities, the inhibition by azide is especially very pronounced at low light intensities (fig. 70a), and thus increases the S-shape of the curve.

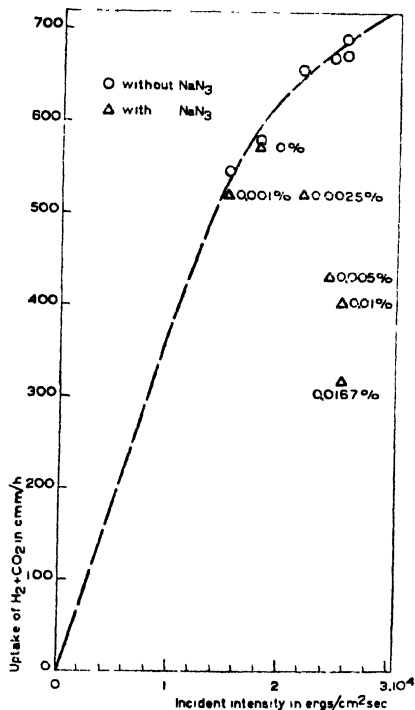


Fig. 68. Influence of sodium azide upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 6.8,  $29^\circ$ , high light intensities). Exp. of 28.5.'40.

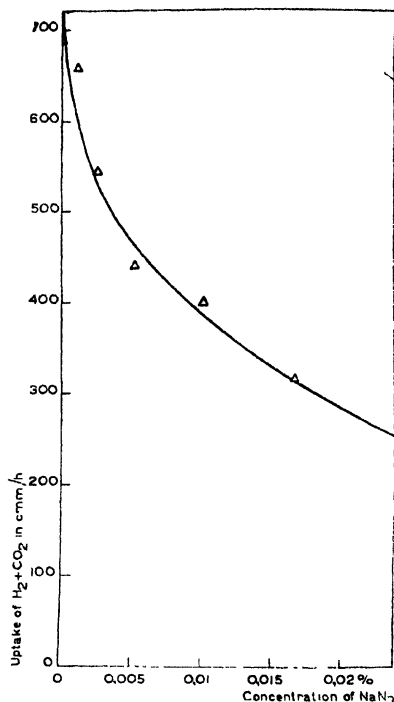


Fig. 68a. Influence of sodium azide upon the rate of photosynthesis, derived from fig. 68 for incident intensity =  $2.8 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup>sec.

b. The influence of sodium azide on fluorescence. Fig. 71 shows the influence of sodium azide at  $29^\circ$ , pH 6.8, in the absence of a hydrogen donor. Contrary to what we have seen with cyanide and hydroxyl amine, a marked influence is present. It manifests itself in two ways. Low concentrations of azide cause a decrease of the fluorescence at high light intensities, of the same type as was found with the supply of limited amounts of hydrogen donor. High concentrations cause a straightening of the curve with a marked increase of fluorescence at low light intensities.

Fig. 72 shows the influence of sodium azide in the presence of hydrogen under the same further conditions as above. The set of curves is similar to those obtained without hydrogen donor. A remarkable new feature is the appreciable increase of fluorescence, observed at low and medium light intensities with rather low concentrations of the poison.

Fig. 73 shows the analogous experiment at pH 7.6. Apart from certain relatively small quantitative differences the general aspect is the same as at pH 6.8.

c. Discussion. Fig. 71 shows that the

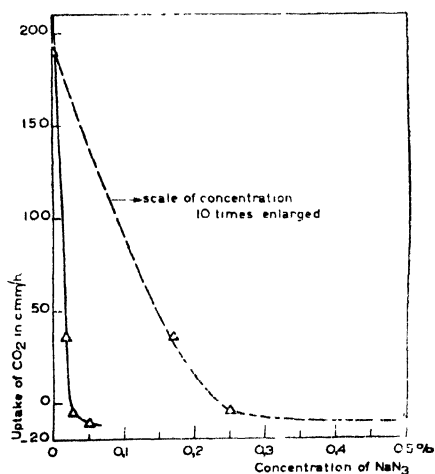


Fig. 69. Influence of sodium azide upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, thiosulphate 1%, pH 6.8,  $29^\circ$ , high light intensity). Exp. of 30.5.'40.



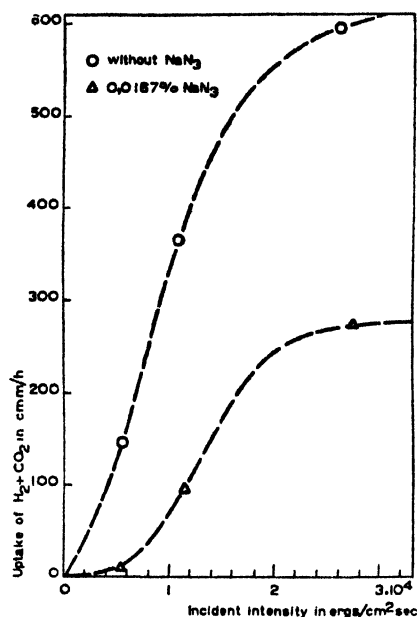


Fig. 70. Influence of sodium azide upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 6.8,  $29^\circ$ ). Exp. of 29.5.'40.

influence of low concentrations of azide upon fluorescence in the absence of a hydrogen donor is comparable with the influence of a hydrogen donor. With high concentrations the pronounced straightening of the curve suggests that the azide accepts practically all energy transferred, which energy is then lost for the process of photosynthesis. A similar phenomenon was observed with high concentrations of cyanide, so

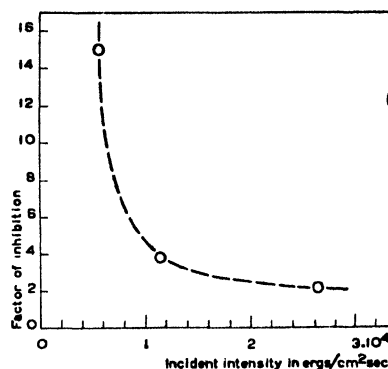


Fig. 70a. Factor of inhibition of photosynthesis upon addition of sodium azide, derived from fig. 70.

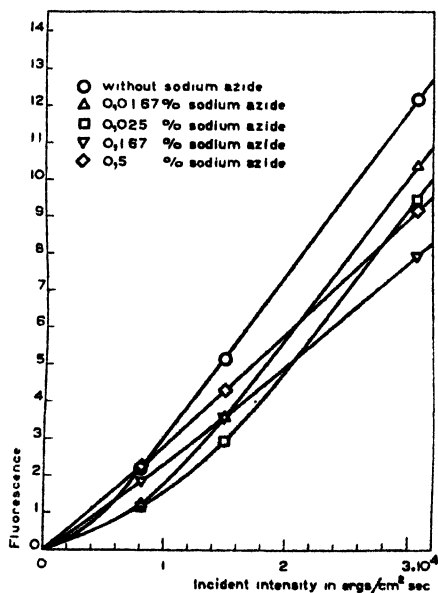


Fig. 71. Influence of sodium azide upon the intensity of fluorescence in the absence of a hydrogen donor ( $\text{CO}_2$  5%, pH 6.8,  $29^\circ$ ). Exp. of 30.5.'40.

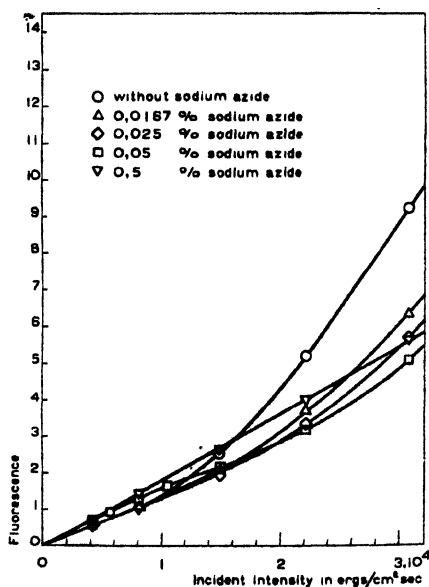


Fig. 72. Influence of sodium azide upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 6.8,  $29^\circ$ ). Exp. of 29.5.'40.

that in high concentrations the specific difference between the two types of poison has disappeared.

Thus, azide appears to be no specific poison for dark systems, contrary to what was concluded for cyanide and hydroxyl amine, partly already by previous authors, partly from our own observations. The azide can even be considered to be more directly connected with the energy transfer than a hydrogen donor, the latter wanting a dark system to render it capable of influencing the energy transfer.

It is somewhat difficult to explain, why low concentrations of azide do not yet increase appreciably the initial slope of the curve of fluorescence against intensity in donor-free suspensions. Various reasons may be responsible for this behaviour. The energy transfer in the presence of high concentrations of azide indicates that the azide allows a better transfer of energy than the transfer system free from energy acceptor. So, on supplying a small dosis of azide an increased transfer will be obtained due to the combined presence of the energy acceptor derived from intra-cellular donors and the azide. These curves also initially run below the one for high doses of azide which may be due to the fact that at low concentrations of azide the energy acceptors, derived from intra-cellular donors are present at its side, and allow a still better transfer than the azide. With high concentrations of azide they will be removed from the transfer system by competition.

Besides this another factor might come into play, *viz.*, the inhibition of the systems using transferred energy. This might indirectly lead to a more extensive occupation of the transfer system by the available small „stream“ of cellular donors furnished per unit of time. But this factor ought to have become also observable in donor-free suspensions with cyanide or hydroxyl amine, which was not the case. So it is obviously of little importance and the first explanation is preferent.

We will now discuss the behaviour of fluorescence and gas exchange towards azide in the presence of a hydrogen donor. The increase of the initial slope of the fluorescence curve at medium and high concentrations of azide is again an indication for the direct transfer of energy to azide. Moreover it shows that the poison accepts the energy with a somewhat smaller transfer constant than the energy acceptors derived from hydrogen donors, but the transfer is much better than without supply of hydrogen donors. It is interesting to notice that the intensity region in which the fluorescence remains on the initial slope, due to the acceptance of energy by the poison approximately coincides with the region in which the gas exchange shows the strongest inhibition. At higher intensities the slope of the fluorescence curve in the presence of medium concentrations of poison decreases; at still higher intensities it increases again.

The curves of gas exchange against incident intensity show a much stronger S-shape than without poison. For two reasons this increased S-shape, *i.e.*, the decrease of the inhibition with increasing light intensity, cannot fully be explained as an effect of auto-assimilation, as was suggested for the normal S-shape in § 12. Firstly the influence of the auto-assimilation cannot account for the just mentioned parallelism of the behaviour of fluorescence with that of gas exchange, but on the contrary would lead to the expectation of a „normal“ course of the fluorescence curve. Secondly the amounts of auto-assimilation (AA' in fig. 94) deducible from our experiments with azide are much higher than those without poison and it can hardly be visualized that the poison should stimulate the auto-assimilation process. Therefore, it seems more probable that the relative occupations of the transfer system by energy acceptor and poison changes with increasing light intensity.

The decreased occupation of the transfer system with poison with increasing light intensity can be explained by assuming that poison molecules that have accepted energy are removed from the transfer system in a time shorter than the one required for supplying a new molecule. As soon as an open place appears, both the azide and the energy acceptor derived from the hydrogen donor will compete for it more or less successfully according to their rates of supply. This hypothesis can explain simultaneously the decrease of the fluorescence slope and the recovery of the gas exchange at medium light intensities.

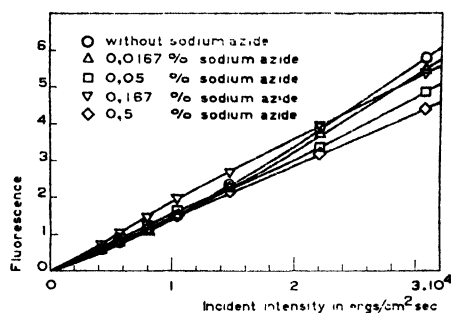


Fig. 73. Influence of sodium azide upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, pH 7.6, 29°). Exp. of 30.5.40.

At high light intensities gas exchange is inhibited, accompanied by a decrease in fluorescence. If only an influence of azide upon the transfer system would exist, no decrease of the saturation value for the rate of gas exchange would occur; only the light intensity at which this saturation is reached would increase. Hence, besides the influence upon the energy transfer the azide also inhibits the system reducing  $\text{CO}_2$ , and we may conclude that the latter system is more sensitive to azide than the system reacting with the hydrogen donor (*cf.* also § 14–16).

For high concentrations (0.167%, see fig. 73) the increase of the fluorescence at medium intensities is very marked. This suggests that then also the system of donor transformation becomes inhibited to a marked degree. For still higher concentrations (0.5%) the straight fluorescence curve indicates that all energy passes to the azide, and that the normal energy acceptor has practically disappeared from the transfer system, owing to the high external concentration of azide.

We must remark that the fluorescence curves for 0.5% azide in the presence and in the absence of a hydrogen donor, differ much in slope, although we consider azide in this concentration to act as the chief energy acceptor. Whether this difference is only incidental or has a still unknown meaning, we cannot decide.

We may summarize the action of azide as follows.

In low concentrations of azide, causing partial inhibition of photosynthesis, the azide acts upon the  $\text{CO}_2$ -reducing system and moreover upon the transfer system, since it accepts energy. The latter action decreases at higher light intensities, a phenomenon which can be understood, assuming that azide molecules are replaced upon the transfer system at a slow rate. For high concentrations of azide (total inhibition) also an influence upon the system reacting with the hydrogen donor appears possible.

## § 18. The influence of ethyl urethane.

a. The influence of ethyl urethane on gas exchange. On the whole the influence of ethyl urethane upon the gas exchange shows great similarity with that of azide.

In figs 74–76 the influence of various concentrations of urethane in the presence of thio-sulphate at pH 6.8 is presented. Here also the feature of the curves is the very strong decrease of the readings at low light intensities, causing a more pronounced S-shape. On the other hand the intensity at which light saturation is reached, does not show a strong shift, the rate of photosynthesis in the light saturation range, however, also shows a very appreciable inhibition. In fig. 77 we represent an experiment from quite another period of our investigation. The characteristics of the curve are exactly the same, so

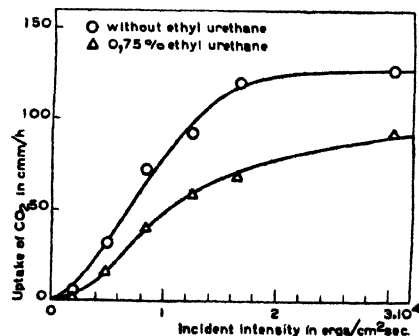


Fig. 74. Influence of ethyl urethane upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, thio-sulphate 1%, pH 6.8, 29°). Exp. of 9.8.'88.

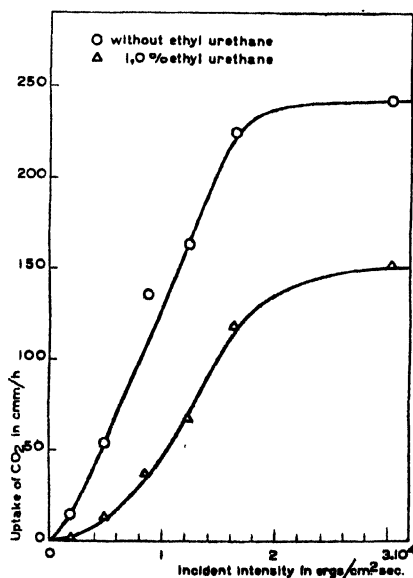


Fig. 75. Influence of ethyl urethane upon the rate of photosynthesis ( $\text{CO}_2$  5%, thio-sulphate 1%, pH 6.8, 29°). Exp. of 9.8.'88.

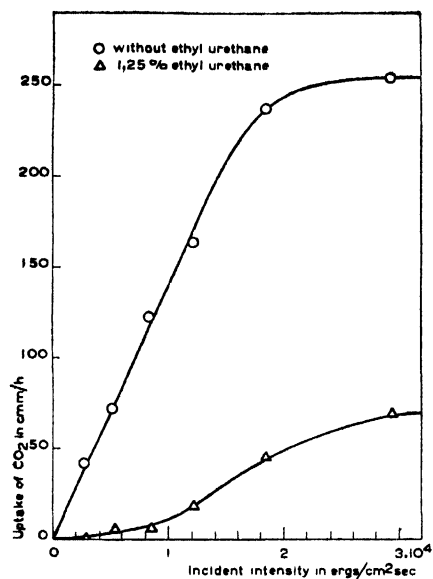


Fig. 76. Influence of ethyl urethane upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, thio-sulphate 1%, ph 6.3, 29°). Exp. of 15.8.'38.

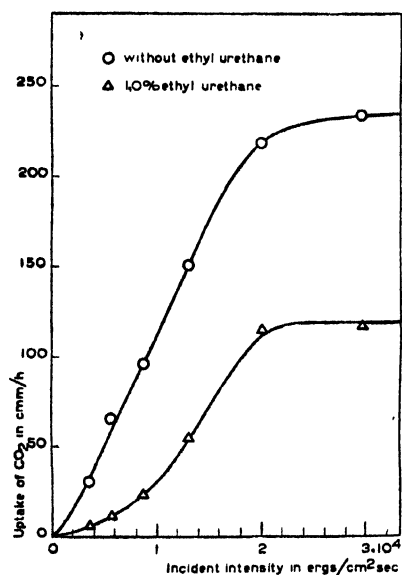


Fig. 77. Influence of ethyl urethane upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, thio-sulphate 1%, ph 6.3, 29°). Exp. of 19.12.'39.

it may well be concluded that the observed features constitute essential properties of the urethane curves. Fig. 77a shows the inhibition factor for various points of the experiments of fig. 77; the inhibition is strongest at low light intensities.

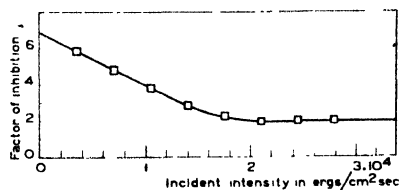


Fig. 77a. Factor of inhibition of photosynthesis upon addition of ethyl urethane, derived from fig. 77.

Total inhibition of photosynthesis is reached at ca 3.0% ethyl urethane. The relation between the maximum rate of gas exchange and the concentration of urethane is not linear.

We have observed many times that especially

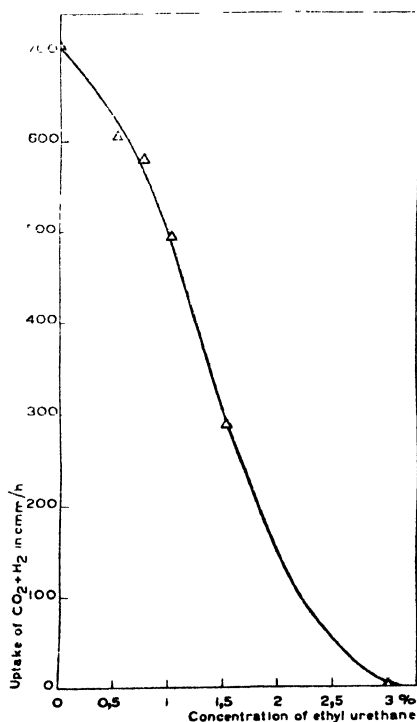


Fig. 78. Influence of ethyl urethane upon the rate of photosynthesis (CO<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub> 15%, ph 7.6, 29°, high light intensity). Exp. of 2.7.'40.

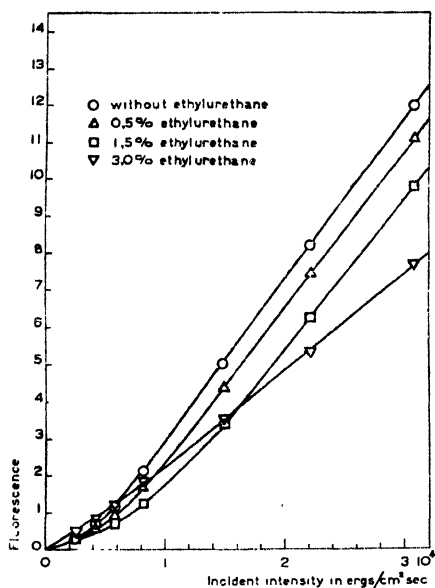


Fig. 79. Influence of ethyl urethane upon the intensity of fluorescence in the absence of a hydrogen donor ( $\text{CO}_2$  5%, ph 7.6,  $29^\circ$ ). Exp. of 2.7.'40.

action of sodium azide and that of ethyl urethane was already indicated. The remarks in the discussion on azide could be made also here, but only the principal conclusions will be repeated.

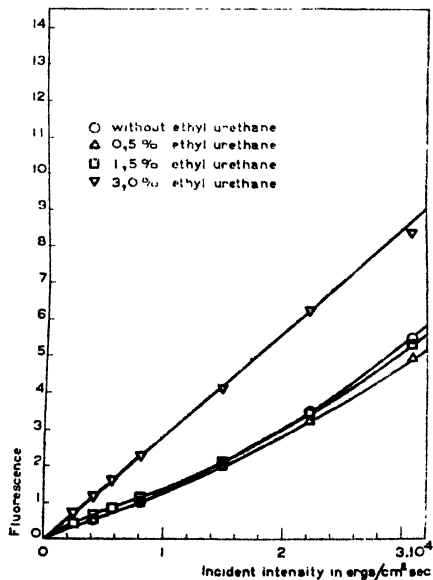


Fig. 80. Influence of ethyl urethane upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{H}_2$  15%, ph 7.6,  $29^\circ$ ). Exp. of 2.7.'40.

in the range above 1.0% a steep increase of the inhibition occurs, but we have not made much study of this relation. An experiment of this type with hydrogen as a donor, at ph 7.6, is given in fig. 78, which shows also the mentioned properties.

b. The influence of ethyl urethane on fluorescence. Also this influence shows great similarity with that observed with sodium azide. Fig. 79 shows the curves for a donor free suspension, at  $29^\circ$ , ph 7.6. They are practically identical with those of fig. 71, representing the same set for azide.

Also in the presence of donor the sets of curves are fully analogous to those obtained with azide. Fig. 80 represents the curves for a suspension in the presence of hydrogen at  $29^\circ$ , ph 7.6.; fig. 81 gives a set of curves for a suspension with thio-sulphate at  $29^\circ$ , ph 6.8. With thiosulphate the character of the curves is the same as with hydrogen; a certain shift in the influence of different concentrations is observable. In all cases the increase in fluorescence at low and medium light intensities is obvious, it is even more pronounced than in the case of azide.

c. Discussion. In the experimental part of this section the evident parallelism between the

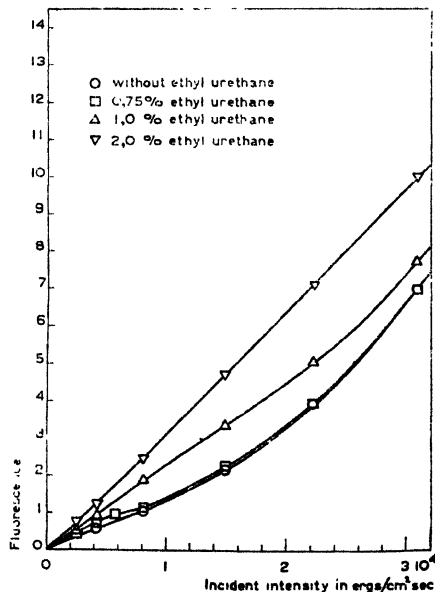


Fig. 81. Influence of ethyl urethane upon the intensity of fluorescence ( $\text{CO}_2$  5%, thiosulphate 1%, ph 6.8,  $29^\circ$ ). Exp. of 19.12.'39.

The influence on gas exchange especially at low light intensities and the influence on fluorescence in donor-free suspensions show that urethane also at low concentrations occupies the transfer system. The molecules of the poison must be assumed to occupy this system directly; the intercalation of an enzymatic system as in the case of the hydrogen donors, is improbable. For high concentrations of urethane the mentioned effect becomes still more manifest, it was also observed for high concentrations of cyanide and hydroxyl amine.

The rate of photosynthesis in the region of light saturation, which rate is also much reduced, indicates that also the dark systems do not remain undisturbed. The decrease of fluorescence at high intensities, *i.e.*, increase of acceptor concentration at the transfer system, indicates that also here the most sensitive dark system is that, using the energy transferred, and reacting with carbon dioxide. Here the same remarks hold, as have been made concerning azide.

## § 19. Discussion of the relative values of transition point intensities of gas exchange and fluorescence.

In Chapter IV it was remarked that there exists an unmistakable correlation in the situation of the transition points for gas exchange and fluorescence, which also remained evident whilst varying temperature and pH. This correlation pointed to the conclusion that the system responsible for the limitation of the transfer of energy from the bacterio-chlorophyll may at the same time constitute the limiting factor for the rate of photosynthesis.

In Chapter V we have become acquainted with another dark system reacting with  $\text{CO}_2$ , which may also limit photosynthesis, *e.g.*, in the presence of cyanide, but which has no direct influence upon the transfer of energy.

It is interesting to know which of the two dark systems is responsible for the saturation of gas exchange under various conditions. For, since both systems must be considered to be enzymes, it is quite well conceivable that their capacities are differently influenced by variations in external conditions, such as temperature, hydrogen donor, and pH.

It is clear that, when the system reacting with  $\text{CO}_2$  limits the rate of photosynthesis, the transition point intensity for fluorescence will be higher than the one for gas exchange. The reverse, however, cannot be reconciled with our conception, since it would mean that photosynthesis could proceed unimpeded, under conditions which already limit the energy transfer. Therefore, we may expect the transition point intensity for fluorescence to be either equal to, or higher than the one for gas exchange.

As a rule this was actually found to be the case in our experiments. The data presented in Chapter IV lead to the conclusion that the transition point intensities for gas exchange and fluorescence generally show only small differences at pH 6.3, both in the presence of hydrogen and of thiosulphate, whereas at pH 7.6 with hydrogen as a donor the transition point intensity of fluorescence is higher than the one of gas exchange.

At the time these experiments were performed, the different influence of the concentration of the bacterial suspension upon the transition point intensities for gas exchange and fluorescence, discussed elsewhere (20) had not yet been clearly recognized. For this reason the data in question do not allow a detailed comparison of both transition points. Therefore, we have reexamined the matter with bacterial suspensions at 1/3 of the concentration normally used, at which concentration no complications occur (*cf.* (20)). So far, these experiments have only been performed at 29°. The results sustain the conclusion formerly arrived at, *viz.*, that at pH 6.3, both with thiosulphate and with hydrogen as a donor, energy transfer and photosynthesis become limited at about the same light intensity, whereas at pH 7.6 in the presence of hydrogen photosynthesis becomes limited at a much lower light intensity than the energy transfer. In the first mentioned case energy transfer and photosynthesis will, at light intensities above the transition point intensity, become limited by the same enzyme system, *viz.*, that reacting with the hydrogen donors, whereas in the second case gas exchange will earlier become limited by the system reacting with carbon dioxide.

It has been remarked in Chapter V, § 15, that in many cases both processes must be consi-

dered to have about the same capacity. It is, therefore, conceivable that a small shift in the conditions or in the previous history of the cell material may result in a change of the limitations of gas exchange by either of the two systems. Our data at low bacterial concentration are so far not sufficient to establish this definitely, but we hope to be able to extend them in the near future. From the evidence so far available it may be concluded that at 29° and ph 6.3 the system of donor transformation is responsible for the light saturation both in the presence of hydrogen and of thiosulphate, and thus has a smaller capacity than the system reacting with CO<sub>2</sub>, whereas the reverse holds with hydrogen at 29° and ph 7.6.

Since both systems probably are strongly sensitive to temperature, a difference in their temperature characteristics leaves open the possibility that the situation at lower temperatures is not the same as that at 29°. So far, however, no indications for such a difference were found, but also here more data with dilute suspensions are wanted to settle this question definitely.

## Chapter VI.

### Miscellaneous observations.

#### § 20. The influence of sodium and potassium ions in the phosphate buffer.

Normally we used a mixture of sodium monophosphate and potassium biphosphate as a buffer. Therefore, variations in ph were accompanied by variations in the relative amounts of sodium and potassium ions in the suspension-medium. In order to see whether this variation had any influence upon the rate of photosynthesis, we have performed an experiment in which potassium biphosphate was combined either with sodium monophosphate or with potassium monophosphate in such a way that buffer solutions of three different ph-values, viz., 6.3, 7.0 and 7.6 were obtained. The donor was thiosulphate, the temperature 29° C; photosynthesis was measured at high light intensity. The dark metabolism was measured only at ph 7.6. Both in dark and in light metabolism no appreciable difference was observed in the two types of buffer solutions. This can be seen from Table VIII in which also data concerning the composition of the suspension media and the values of the intensity of fluorescence at high incident light intensity are given. In general the rate of gas exchange in the suspensions with only potassium phosphate is somewhat higher. The same result was obtained from the measurement of fluorescence, at each ph the course of the curves was nearly the same but a little shifted in favour of the potassium-buffer. A large difference, however, could not be expected since also the suspension prepared with the potassium salts contained a large amount of sodium ions due to the addition of sodium chloride and sodium thiosulphate.

TABLE VIII

Photosynthesis in phosphate buffers with different Na- and K-content.

(Exp. of 22.5.'40).

ph	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1/6 mol.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1/6 mol.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1/6 mol.	NaCl 6%	Thiosulphate 8%	Bacterial suspension in H <sub>2</sub> O	Uptake of carbon dioxide in cmm/hour	Intensity of fluorescence (I <sub>inc</sub> = 3.10 × 10 <sup>4</sup> ergs/cm <sup>2</sup> sec.)
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm		
6.3	—	0.2	0.6	0.2	0.25	0.75	128*)	8.0
6.3	0.2	—	0.6	0.2	0.25	0.75	122*)	8.2
7.0	—	0.5	0.3	0.2	0.25	0.75	74*)	8.8
7.0	0.5	—	0.3	0.2	0.25	0.75	61*)	9.5
7.6	—	0.7	0.1	0.2	0.25	0.75	27*)	9.6
7.6	0.7	—	0.1	0.2	0.25	0.75	24*)	10.0
7.6	—	0.7	0.1	0.2	0.25	0.75	—20 (dark)	—
7.6	0.7	—	0.1	0.2	0.25	0.75	—21 (dark)	—

\*) Without correction for dark metabolism.

## § 21. Absorption spectrum of cultures.

The variations observed in the infrared absorption spectrum of cultures of strain D (5) made it desirable also to examine the absorption spectrum of the cultures used in this study. In some of the earlier experiments the existence of different types of spectra in strain D was not yet known. From about 1.9'39 up to about 1.4.'40, in which interval the greater part of the observations dealt with in this paper was made, the infrared absorption spectra of all cultures used were determined. These measurements, comprising in total about 130 cultures, taught that the type with 2 well distinguishable maxima in the infrared (*cf.* (5), fig. 2a) was the common one in well grown cultures incubated in the light intensity of ca 600 lux applied during the incubation, as was also concluded before (5). Hardly any exception from this type was found, the ratio between the two infrared maxima showing only small variations. Moreover it appeared that the absorption spectrum in the region near the D-line of sodium did not vary, the coefficient of absorption there being roughly proportional to the sum of the heights of the two maxima in the infrared. Later on, daily control was omitted.

## § 22. On the fluorescence of the pigment-protein complex in solution and the relation to the fluorescence in the living cell.

The pigment-protein complex was set free by the grinding-method previously described (21). The preparation was performed under anaerobic conditions. The solution or suspension of the pigment-protein particles was purified by centrifuging, and diluted. From this dilution 2 ccm was introduced into a WARBURG vessel under  $N_2 + 5\%$   $CO_2$ , and the fluorescence was measured in the same way as in the case of a suspension of living cells. The intensity of fluorescence is approximately the same as in the living cells. Observations regarding the fraction of fluorescence light transmitted by the filter RG 7 (SCHOTT and Gen.) both in the living cells and in the colloidal solution suggest that also the fluorescence spectrum is the same (*cf.* § 4).

In general the curves of the colloidal system have the character of donor-free curves for cells, but they are less distinctly built up of two parts with different slopes. We have also tested the influence of addition of hydrogen donors, *i.e.* hydrogen and thiosulphate. Both compounds have none, or at most a very small, influence upon the fluorescence (fig. 83). Evidently the hydrogen donors as such are not able to influence the transfer of energy from the bacterio-chlorophyll.

In the living cell addition of hydrogen donors causes a strong decrease in fluorescence, also when photosynthesis is eliminated by an inhibition elsewhere, *e.g.*, by withdrawal of  $CO_2$ , or by addition of cyanide. We may assume that the direct contact of the pigment molecule with its protein is not much altered in the extracted complexes (21). So we may conclude that in the colloidal extract the supply of the transfer system with energy acceptor is disturbed. We have seen in the preceding sections that an enzyme system must be considered to be involved in this supply. Obviously this enzyme system is wholly or at least for the greater part destroyed by the extraction. Conversely the fact that hydrogen donors have practically no effect upon fluorescence in the colloidal extract proves once more the existence of a system that transforms the donor into an energy acceptor in the living cell.

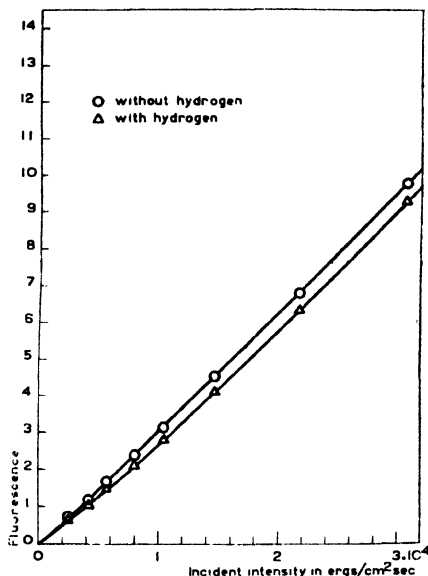


Fig. 82. Relation between the intensity of fluorescence of a pigment-protein extract and the intensity of incident light, in the absence and in the presence of hydrogen ( $CO_2$ , 5%,  $H_2$  resp. 0 and 15%, phosphate buffer pH 7.4, 29°). Exp. of 20.3.'40.



### § 23. On the rise in fluorescence observed under certain conditions in the presence of gaseous hydrogen as a hydrogen donor.

It was mentioned in § 4 that also in the measurements of fluorescence the WARBURG-manometers could be used, and were shaken in the same way as in the measurements of gas exchange. Immediately before reading the deflection of the galvanometer, the shaking was stopped.

In the presence of hydrogen a remarkable change in the intensity of fluorescence was observed, when the shaking was not started again after a few moments. A few examples of this change are represented in fig. 88 for different intensities of illumination. After stopping the shaking, fluorescence remains constant for about 1 minute at our highest light intensity, then a rather steep rise occurs and a new, higher, stationary level is reached. For each intensity of

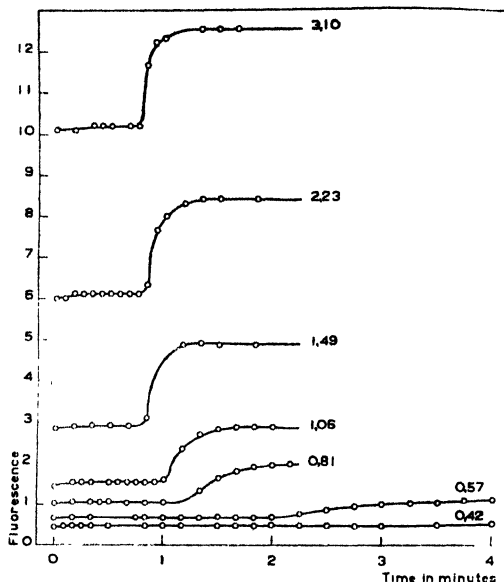


Fig. 88. Course of fluorescence with time in non shaking vessels containing hydrogen as a donor at different light intensities indicated in terms of  $10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. The shaking is stopped at time = 0. (CO<sub>2</sub> 5%, H<sub>2</sub> 15%, ph 6.8, 29°). Exp. of 4.12. '39.

illumination both values are fully reproducible, the lower value is within a wide range independent of the duration and the velocity of the preceding shaking. The time elapsing between the end of the shaking and the rise of fluorescence appears to be connected with the rate of photosynthesis, as it is constant in the region of light saturation and increases if the rate of photosynthesis is lower owing to application of low light intensities (fig. 88). The same elongation of the time mentioned was observed when photosynthesis was partially inhibited by cyanide. The fluorescence values plotted in the various figures in the preceding chapters are taken shortly after stopping the shaking. They represent the low values mentioned above. Plotting the high values against the incident intensities we obtain a curve very much resembling those for suspensions with limited concentrations of hydrogen donor. With thiosulphate as a donor the rise of fluorescence is not observed. This suggests that the phenomenon is due to the circumstance that in a non-shaken suspension a sufficient supply of the suspension liquid with hydrogen from the gas phase can not be

maintained. This conclusion is supported by the following computation. We can calculate the amount of hydrogen present in the suspension at the moment shaking is stopped, assuming that equilibrium with the gas phase exists. Besides this we can compute the time ( $t$ ) necessary for the consumption of this amount of hydrogen by the bacteria at various light intensities, assuming that the initial value of the rate of photosynthesis is maintained during this period. We now can compare this time with the time ( $t'$ ) during which fluorescence remains at its low level. Data from one experiment have been collected in Tabel IX. The assimilation values have been taken from an experimental curve, estimating the amount of hydrogen consumed as  $2/3$  of the total reading (<sup>18</sup>).

It is seen that the values for  $t$  and  $t'$  agree fairly well for all intensities. The difference of 15–25% appearing in all cases can easily be explained by taking into consideration that the rate of photosynthesis after the time  $t'$  only gradually decreases until an equilibrium between gas diffusion and gas consumption is reached.

It may be asked what mechanism can be responsible for the deficiency of hydrogen in the medium. Two possibilities are conceivable. The supply of hydrogen to the bacteria may either be limited by the rate of entrance of hydrogen from the gas phase into the liquid — the so-called invasion velocity

TABLE IX  
Comparison of times  $t$  and  $t'$  (see text)  
ph 6.8, temp. 29°, exp. of 4.12.'89.

Incident intensity in $10^4$ ergs/cm <sup>2</sup> sec.	Uptake of H <sub>2</sub> + CO <sub>2</sub> cmm/h	Uptake of H <sub>2</sub> cmm/h.	$t$ sec.	$t'$ sec.
3.10	492	327	54	47
2.23	480	320	56	49
1.49	425	283	63	49
1.06	358	238	75	59
0.81	288	192	93	74
0.57	175	117	153	124
0.42	108	72	248	190

(C. BOHR <sup>29</sup>) — or by the diffusion velocity, i.e., the rate of equalizing the concentration of hydrogen in all parts of the suspension liquid.

Data concerning the invasion velocity of hydrogen into water are not available; they exist, however, for oxygen and nitrogen (<sup>30</sup>), gases with about the same solubility as hydrogen, but with larger molecules. Thus the invasion velocity for nitrogen may well be considered to form a lower limit for that of hydrogen. In our case (15% H<sub>2</sub> in gas phase, temperature 29°, bottom area 7 qcm) this limit was thus estimated at 0.14 cmm/sec., which is higher than the consumption velocity by the bacteria (0.09 cmm/sec.), so that it is improbable that the invasion velocity would represent here a limiting factor.

Data concerning the diffusion velocity of hydrogen may be taken from investigations of HAGENBACH <sup>31</sup>) and of TAMMANN and JESSEN <sup>32</sup>). Assuming a consumption velocity by the bacteria equal to that measured in gas exchange experiments, it can be computed that there must exist a concentration gradient from 2.5 cmm/cm at the surface, the value indicating equilibrium with the gas phase, to zero at a depth of 0.01 mm. The total height of the suspension being ca 3 mm it can be concluded that the stationary concentration in almost the whole suspension will be zero.

So diffusion may well be considered to be the limiting principle, and to be responsible for the special behaviour of fluorescence in the presence of hydrogen under the conditions, discussed in this section.

It remains remarkable that fluorescence does not increase more gradually in these experiments, since other evidence has led to the conclusion that still at rather high partial pressures the rate of photosynthesis is limited by the pressure of hydrogen (§ 8). It is therefore not yet quantitatively understood why the rise of fluorescence does not start sooner and does not proceed more gradually.

## § 24. The total yield of fluorescence.

One can define as the yield of fluorescence the ratio between the total energy of the fluorescence light and the absorbed incident energy. In a previous paper this yield was preliminarily estimated at about 0.005%. This figure was obtained with concentrated suspensions, viz., of 80 TROMMSDORFF-units per ccm. As the fluorescence of *Chromatium* is subjected to self-absorption (cf. (<sup>20</sup>)) we endeavoured to repeat the determination with the more dilute suspensions (10 Tr. units per ccm), used in the present investigation. The figure now obtained was considerably higher than the earlier one, viz., about 0.10%, so coming into the same order of magnitude as for *Chlorella*. The large difference between the two values successively obtained can only partly be due to the self-absorption of the suspension; for the greater part it will probably have to be ascribed to the use of less suitable filterglasses in the earlier determination.

The present determinations of the yield were made as follows.

The incident energy was measured with a standardized thermopile (cf. § 4), the intensity of fluorescence with the aid of a photocell-amplifier. The absorbed energy is connected with the incident energy by the absorption factor of the suspension, determined in the white sphere. The measured energy of fluorescence is connected with the total emitted energy by a geometrical factor, determined by the dimensions of the apparatus and the course of the light rays.

So, in order to compute the yield of fluorescence, two sets of instrumental data are necessary, *i.e.*, 1) those establishing the connection between the indications of the thermopile and the photocell-amplifier for the spectral region of the fluorescence light; 2) those establishing the geometrical factor mentioned.

*Ad 1)* As the light of fluorescence is too weak to be used for the establishment of the relation of the indications of the thermopile and the photocell-amplifier, we have used herefore the two infrared lines of a Cs-lamp ( $\lambda = 8521 \text{ \AA}$  and  $\lambda = 8948 \text{ \AA}$ ), obtained by filtering its total emission with the SCHOTT-glasses RG 5 (2 mm) and BG 3 (1 mm).

At a distance of about 50 cm from the Cs-lamp the indication of the thermopile was compared with indications of the photocell-amplifier put at the same place, before and afterwards. For the measurement with the photocell a set of neutral glasses (3 mm NG 8 of SCHOTT and Gen.), and a diaphragm, of 0.19 cm<sup>2</sup> opening, were applied. The wavelengths of the Cs-lines differ only little from the maximal region of fluorescence: as the sensitivity of the photocell does not vary much in this region, the use of the Cs-lines is allowed to establish the required connection.

We found that after correction for the influence of the SCHOTT-glasses and reducing to 1 cm<sup>2</sup> of the photocell, for Cs-light a deflection of 1 cm in connection with our thermopile would correspond to one of 17600 cm of our amplifier, at the sensitivity normally used.

*Ad 2)* The fraction of the total fluorescence light actually measured by the photocell was determined with the aid of a magnesium oxide screen. The indication of the thermopile upon incident light was compared at two places, *viz.*, a) at the place of the bottom of the vessel in the thermostate, and b) at the place of the photocell, when the screen is put at the place of the bottom of the vessel.

The ratio of both indications was found to be 0.02. In order to obtain from this number the desired geometrical factor we have to take into account a few corrections, *viz.*,  $\alpha$ ) that the magnesium oxide screen does not reflect the whole incident light energy; in our case it was only ca 60%;  $\beta$ ) that the angular distributions for fluorescence and for the reflection of the magnesium oxide are probably not the same;  $\gamma$ ) that focussing the reemitted light on the photocell will generally cause a change of the illuminated area; in our case it was reduced to 0.41 of its original size.

Assuming that the suspension of bacteria emits equal amounts of fluorescence upward and downward, and that LAMBERT's law holds both for the emission of the bacteria and the reflection of the MgO, a correction amounting to  $\frac{50}{60} \times 0.41 = 0.34$  has to be applied. If on the contrary only the light from the screen obeys LAMBERT's law, but the fluorescence light is sent homogeneously in all directions, and if it is taken into account that both emissions are observed under an angle of about 30°, this correction amounts to  $\frac{50}{60} \times 0.41 \times \frac{1}{2 \cos 30^\circ} = 0.20$ . We believe to be near to the truth when applying a correction factor of 0.30.

Thus for the geometrical factor a value of  $0.30 \times 0.02 = 0.006$  is obtained. By computation from geometrical data (opening of the lens, reflection by mirror and lens surfaces) a factor of the same magnitude has been found.

We will now consider a deflection of the amplifier of 6 cm due to the fluorescence of the suspension of bacteria upon the intensity  $I_0$ , being about the value obtained by extrapolation of the initial slope of the curve of fluorescence against incident intensity. The total energy of fluorescence would then correspond to an indication of  $\frac{1}{0.006} \times 6 = 1000 \text{ cm}$ .

On the thermopile the intensity of incident light  $I_0$  causes a deflection of 37.2 cm. The absorption of the suspension of bacteria in sodium light is about 0.60, the factor  $f$ , reducing the intensities of the light used to their equivalent sodium light intensities is 0.66 (*cf.* § 4). Therefore, the intensity actually effective would give a deflection of about  $0.66 \times 0.6 \times 37.2 = 14.8 \text{ cm}$  \*). Since the bottom area of the vessel is 6.69 cm, the absorbed energy would correspond to a deflection of  $6.6 \times 17600 \times 14.8 \text{ cm} = 1.720.000 \text{ cm}$  on the photocell, assuming the sensitivity of the photocell, obtaining in the spectral region of fluorescence light.

\*) The error, introduced by the fact that the mean energies of quanta of Na-light and the light used are not equal, which error amounts to about 5 %, is neglected here.

As the indication given by the photocell due to the total amount of fluorescence light would correspond to 1000 cm, the yield of fluorescence is equal to  $\frac{1000}{1.720.000} = 0.06\%$ .

Finally, taking into account the influence of self-absorption of the fluorescence light and its weakening by the Schorr-filter RG 10 the yield can be computed to 0.10%.

When we express both fluorescence and incident intensity in quanta, the yield amounts to  $\frac{h\nu_{inc}}{h\nu_f} \times 0.10 = 0.15\%$ . It must be emphasized that the yield considered is that for low intensities (the „initial slope” cf. § 6). With respect to the „final slope” the yield is about 4 times higher.

## § 25. On the initial changes in fluorescence.

Some preliminary observations concerning the initial changes occurring in the intensity of fluorescence after admitting the light, may be briefly discussed. They were recorded in an early stage of our investigation; later on we always used vessels with suspension, previously illuminated during the parallel measurements of gas exchange (§ 4).

In fig. 84 the general type of the fluorescence-time curve, recorded at 29° with thiosulphate as a hydrogen donor, has been represented. One is struck firstly by the general similarity with the curves obtained for *Chlorella* (3). So far, our material is still too scanty to decide in

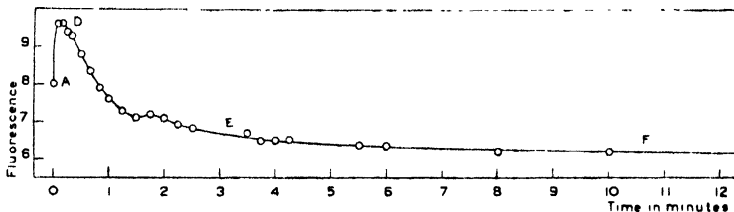


Fig. 84. Initial changes of fluorescence after the start of an illumination. (General type of curve.  $I = 3.10 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup>sec. (CO<sub>2</sub> 5%, thiosulphate 1%, ph 6.3, 29°). Exp. of 14.12.'39)

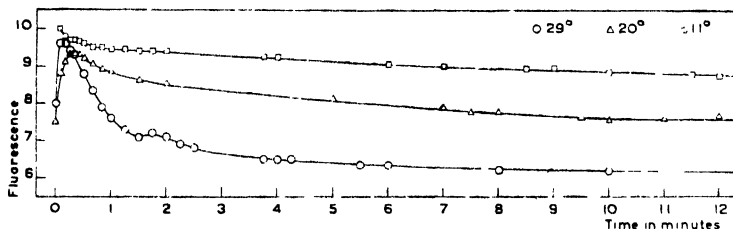


Fig. 85. Initial changes of fluorescence after the start of an illumination. Influence of temperature.  $I = 3.10 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec (CO<sub>2</sub> 5%, thiosulphate 1%, ph 6.3). Exp. of 14.12.'39.

detail in how far the special constitutive parts of the curve are homologous with those of the *Chlorella*-curve; the placing of the letters along the curve must, therefore, be considered to be tentative (cf. (3), fig. 2).

Some observations may now be mentioned. Fig. 85 represents

the influence of temperature. The curves have been taken with the same vessel and can, therefore, be directly compared. We will here draw attention to the fact that the slope DE shows a strong dependence on temperature. We are inclined to connect the smoother slope at lower temperatures with the influence of temperature observed in the stationary state, which was interpreted as an influence upon the supply of the energy transfer system with energy acceptor derived from the hydrogen donor.

The influence of temperature appears to be of the same type as that observed in green leaves by KAUTSKY (33) and as the influence of cyanide observed in *Chlorella*. Founded upon KAUTSKY's deductions and our own observations we have connected the phenomenon in *Chlorella* with the production of oxygen in photosynthesis and the inhibiting influence of molecular oxygen upon fluorescence in chlorophyll containing organisms (3). As the production of molecular oxygen, also intermediately, may well be definitely excluded for purple sulphur bacteria it cannot be brought into play in the explanation of the slope DE in this case. All changes in fluorescence may be considered to reflect changes in the total transfer probability  $\beta$  (3, 13). It was argued before (3) that these changes generally

bear the character of shifts in the state of oxido-reduction at the transfer surface. Also the change reflected by DE may belong to this same class. Then, however, a difference remains in so far, that in *Chlorella* apparently oxygen or at least oxidized compounds decrease fluorescence, whereas in purple bacteria reduced compounds are connected with a better transfer and thus with a lower fluorescence. A more profound study of these phenomena will no doubt lead to an explanation of this difference. We have some evidence that the influence of oxygen upon fluorescence, observed in *Chlorella*, does not exist in purple sulphur bacteria. It was already concluded from previous observations that also in *Chlorella* oxygen only indirectly influences the transfer of energy to the process of photosynthesis.

The part AD of the curve is probably also somewhat affected by temperature but this is not yet certain.

It lies much at hand to ask whether the presence of a hydrogen donor influences also the initial stages of fluorescence. Indeed such an influence is very marked. In fig. 86 the time course

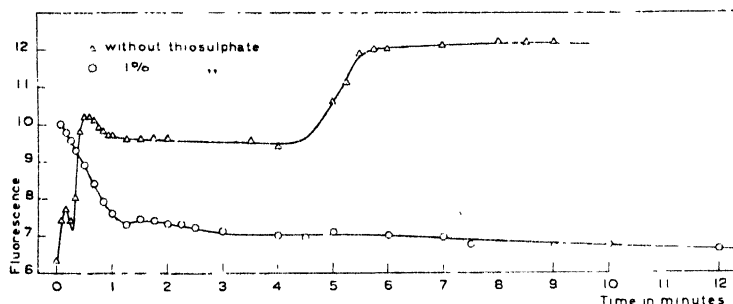


Fig. 86. Initial changes of fluorescence after the start of an illumination. Influence of donor supply.  $I = 3.10 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. (CO<sub>2</sub> 5%, ph 6.3, 29°). Exp. of 12.12.'39.

of fluorescence of a suspension with thiosulphate and one without hydrogen donor are compared. The irregularity in the part AD will not be discussed, although it has been observed also on other occasions. We have, however, so far not yet any indications as to its meaning. A few words may be said concerning the part DE. It is seen that the

decrease is much less pronounced in absence of donor. Moreover after a few minutes a sudden rise of fluorescence is observed. The moment at which this rise occurs differs rather considerably in various experiments. It is tempting to bring this rise into connection with the impossibility to keep the transfer system fully occupied with energy acceptor in the absence of externally supplied donor. This possible explanation is strongly favoured by the result obtained with repeated illumination in the absence of hydrogen donor (fig. 87). Then the depression after D is successively decreased and finally practically absent, which strongly suggests that the amount of energy acceptor initially present is then consumed and cannot quickly enough be replaced.

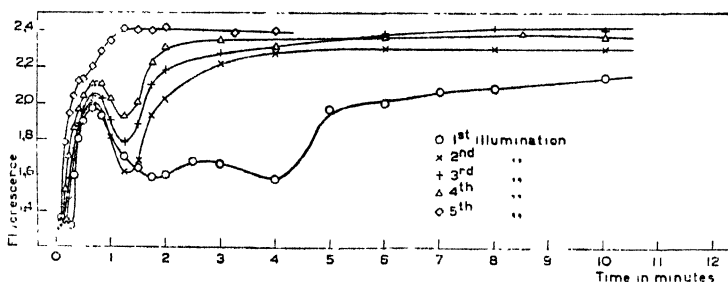


Fig. 87. Initial changes of fluorescence after the start of an illumination.  $I = 1.0 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. Repeated illumination in the absence of a hydrogen donor with dark periods of 10, 10, 10 and 2 minutes. (CO<sub>2</sub> 5%, ph 6.3, 29°). Exp. of 13.9.'39.

A few observations on the influence of carbon dioxide tend to show that an inhibited transfer is also obtained by removal of carbon dioxide from the gas phase. Also the transitory depression after D in the absence of donor is then less pronounced.

Fig. 88 contains some observations on the influence of a partial inhibition with cyanide. The time effect observed in the absence of donor is present in about the same way as observed

in non-poisoned suspensions. Adding now thiosulphate, the slope of the decline after D remains practically equal; the secondary rise is now absent within the time of observation.

On addition of an amount of cyanide giving a strong inhibition (80–90 %) of photosynthesis a few times a sudden rise of fluorescence similar to that in the absence of donor was observed in the part DE. Concerning the influence of limited amounts of carbon dioxide and of various concentrations of cyanide upon the decline DE we have not yet sufficient observations.

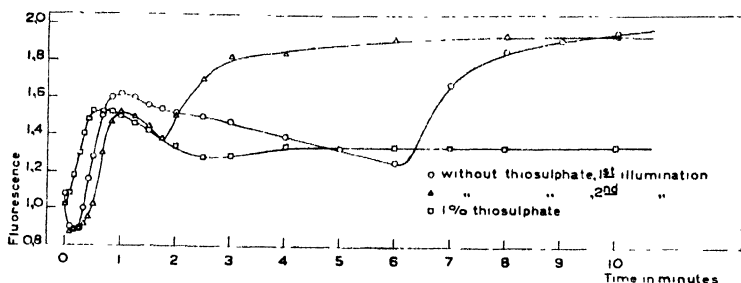


Fig. 88. Initial changes of fluorescence after the start of an illumination.  $I = 1.0 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec. Two illuminations in the absence of a hydrogen donor with a dark period of 10 minutes. Third illumination after addition of thiosulphate 1%. (CO<sub>2</sub> 5%, pH 6.3, 29° KCN 0.01%). Exp. of 18.9. '39.

Finally fig. 89

shows the effect of increasing concentrations of ethyl urethane. The levelling influence, due to the acceptance of energy by urethane itself is very marked with the higher doses.

Summarizing the very preliminary account presented, we may regard the following facts

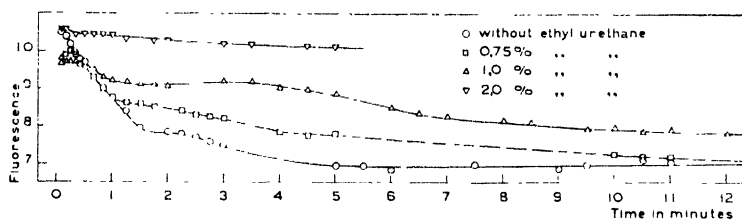


Fig. 89. Initial changes of fluorescence after the start of an illumination. Influence of ethyl urethane.  $I = 3.10 \times 10^4$  ergs/cm<sup>2</sup> sec (CO<sub>2</sub> 5%, thiosulphate 1% pH 6.3, 29°). Exp. of 19.12 '39.

to be sufficiently established: 1) the general resemblance of the fluorescence-time curves with those of *Chlorella*, 2) the influence of temperature upon the slope DE, 3) the influence of hydrogen donor upon the slope DE. Certainly a more extensive study of the

initial states of fluorescence will lead to a better understanding of their relation to the stationary states. Moreover, such a study will undoubtedly contribute to a further insight into the connections between the different types of photosynthesis.

## Chapter VII.

### General Discussion and Summary.

#### § 26. General discussion.

It was discussed in § 2 that the intensity of fluorescence is determined by the possibility of energy transfer from the bacterio-chlorophyll. This possibility is controlled by supply and removal of substances able to accept energy.

In the dark the system of energy transfer will become occupied with various substances, part of which may act as energy acceptors when the cell is illuminated. Evidence is in favour of the assumption that the energy transfer will cause changes in the occupation until a stationary state is reached again, different from that in the dark in this important respect that molecules having accepted energy are continuously removed and fresh ones are supplied again. Whether the occupation of the transfer system under these conditions differs much from that in dark or not, will depend upon the possibility to replace the substances, removed after energy acceptance.

The higher the light intensity is, the more the mechanism supplying energy acceptor will be engaged. As far as the sources of supply are sufficient to meet the requirement, and as far as the presence of excited acceptor molecules at the transfer system does not cause an appreciable obstacle for the supply of non-excited ones, the probability for energy transfer will remain constant, and the concentration of excited bacterio-chlorophyll, and thus also the intensity of fluorescence will be proportional to the absorbed light energy. The energy acceptors are then available in excess. As soon as important sources of energy acceptors become limiting, the energy transfer becomes impeded and fluorescence rises. In the case of the strain of purple sulphur bacteria studied, the shift of the first mentioned situation to the second one lies within the range of light intensities applied. It was established that the presence of a hydrogen donor constitutes the most important factor in the supply of a suitable energy acceptor to the system of energy transfer. From the existence of a concentration of the externally supplied hydrogen donor beyond which an influence upon fluorescence at high intensity does no more exist, we concluded that an intra-cellular process is intercalated between the externally supplied hydrogen donor and the form, in which it is involved in the transfer of the light energy absorbed by the bacterio-chlorophyll. Experiments showed furthermore that temperature and pH strongly influenced this process. We saw that the gas exchange and the fluorescence of bacterio-chlorophyll reacted in a definitely linked way upon the influences discussed; in many cases, especially at pH 6.3, they reached light saturation at the same incident intensity. In these cases the system causing light saturation for the energy transfer, *i.e.*, the system limiting the supply of energy acceptor from a hydrogen donor, also constitutes the limiting factor for the gas exchange.

We may assume that at the system reacting with the hydrogen donors the same final product is formed from a great variety of donors. Since it is also formed from molecular hydrogen, this product can hardly be something else than hydrogen in some state of excitation.

We are so led to see the system reacting with the hydrogen donor as a dehydrogenase, the substrates of which are the hydrogen donors.

Introducing the character R for protein, one may symbolize the enzyme, occupied with hydrogen donor by RDH; the reaction is  $\text{RDH} \rightarrow \text{RD} + \text{H}$ .

The hydrogen thus formed evidently plays an important rôle in the energy transfer. It can be assumed that this hydrogen as such is the energy acceptor, it may as well be assumed that in the transfer system a substance X is present from which only the reduced form XH is able to accept energy. It appears well conceivable that various reducible substances are present, so that the energy acceptors XH, YH, ZH etc. may be formed. It seems plausible to assume that from these energy acceptors H is liberated after acceptance of an energy quantum from the layer of bacterio-chlorophyll.

If one wishes to introduce the symbol HOH into the reaction taking place, one may symbolize the whole reactive complex at the system of energy transfer by RXHOH and, after the action of the above mentioned enzyme, by RXHHOH, after which one H can be dissociated by the light. The difference with green plant cells is apparently the interaction of the „additional” H resulting from the reaction of the hydrogen donor. It is tempting to connect this difference with the energy content of the energy quanta supplied by the bacterio-chlorophyll which is much lower than in the case of green plant chlorophyll. We may put this energy content equal to that of the fluorescence quanta.

The situation may thus be formulated that the interaction of the hydrogen donor enables to dissociate H from HOH with so small energy quanta as supplied by bacterio-chlorophyll. Its primary necessity for the action of energy transfer thus becomes conceivable. It may be remarked that also in the case of green plant cells the dissociation of HOH with the energy quanta available remains a problem, which we intend to discuss elsewhere.

On the other hand we have become acquainted with completely comparable and even stronger changes in the rate of photosynthesis without an appreciable effect on fluorescence. This situation was found when limiting and excess concentrations of carbon dioxide were compared, or when inhibitions with cyanide and with hydroxyl amine were introduced. Then only small variations in intensity of fluorescence accompanied strong changes in gas exchange. It

was argued that the changes of fluorescence may be understood from an indirect influence upon the energy transfer, and thus under the conditions chosen photosynthesis is controlled by processes that are not directly connected with the transfer of energy. It may be emphasized that the supply of carbon dioxide belongs to this class.

We thus arrive at the conclusion that the process of photosynthesis starts with some reaction with the hydrogen donor, leading to the formation of an acceptor at the system transferring the energy from the bacterio-chlorophyll. The action of the light probably leads to the dissociation of the required „reducing agent” from the acceptor. This reducing agent then reacts with carbon dioxide in a dark process. So two dark processes are included in the chain: one reacting with the hydrogen donor, preceding and enabling the transfer of energy, the other one reacting with carbon dioxide, and following the transfer of energy, and influencing it only along indirect ways.

The reader will be aware of the close relationship between this scheme of the course of photosynthesis to which one is forced by the results obtained from the simultaneous measurement of gas exchange and fluorescence, and the ideas proposed on various occasions by VAN NIEL <sup>7, 34</sup>). Also in the scheme of VAN NIEL, proposed 1935 (7) two dark reactions are contained, one in which CO<sub>2</sub>, and the other in which the hydrogen donor is involved, the latter being thought as a restoration reaction of a pigment-water molecule which has acted photochemically. It has been advanced already earlier (2) that we cannot accept that the pigment is stoichiometrically related to the reactive compounds and chemically involved in any reaction, and therefore we cannot accept the details of the mentioned scheme. In 1936 VAN NIEL (34) gave a more tentative description of the mechanism in more general terms, in which is spoken of the „appareil pigmenté” as the seat of the photochemical reaction, and in which moreover the possibility seems to be left open that a compound other than water is the one actually converted photochemically. Also more stress is laid here upon the primary action of the hydrogen donors enabling the photochemical system to „act as a hydrogen donor” for the reduction of CO<sub>2</sub>. It will appear from the experiments and conclusions presented in the present paper that the concept of VAN NIEL, especially as formulated in 1936, in general gives an adequate description of the mechanism of photosynthesis in purple sulphur bacteria.

The definite indication, however, that the action of the hydrogen donor has to precede the formation of a reducing substance at the expense of the light energy and even is necessary for the transfer of the absorbed energy as such, and thus that views ascribing only a secondary rôle to the hydrogen donors may be excluded, could only be gained from the combined study of gas exchange and fluorescence. For the rest we will deal more in detail with theoretical questions in a following paper (13).

Dependent on the experimental conditions we will observe (at high light intensities) either of the two dark processes mentioned above as limiting the rate of photosynthesis. It must be noticed that the influence of both processes upon the rate of gas exchange is of the same type. With excess and with limited amounts of hydrogen donor, at high and at low temperatures, with excess and with limited amounts of carbon dioxide, non-inhibited and inhibited by *e.g.* hydroxyl amine, completely analogous sets of gas exchange curves in relation to light intensity are obtained. From gas exchange measurements alone the place of the hydrogen donor and that of carbon dioxide in the process can not be distinguished. The same type of relation between gas exchange and incident intensity would have been obtained if the action of the hydrogen donor was such as advanced in recent times by NAKAMURA <sup>35</sup>) and by HANSON <sup>36</sup>). In their schemes the hydrogen donor plays the rôle of removing oxygen intermediately produced in photosynthesis, and hence is considered not to be connected with the act of energy transfer.

A similar fundamental uncertainty is inherent to all „BLACKMAN-effects” observed so far in the physiology of photosynthesis, namely whether they represent a limitation by the same link or by different links of the chain of processes. All reactions upon cyanide, temperature, and intermittency of light (37) may be caused by either of the two effects, mentioned above. The additional, more intimate knowledge of the course of photosynthesis which is obtained by studying the fluorescence of the photoactive pigment system in the living cell enables to distinguish between both types of BLACKMAN-effects.



In honour of BLACKMAN's discovery of a twofold character of the process of photosynthesis in green plant cells (WARBURG<sup>38</sup>) called the temperature-sensitive part of the process: „BLACKMAN-reaction". At present we do not know whether the dark processes in photosynthesis of green plant cells and of purple sulphur bacteria are of a similar or of a different nature. As the actual character of the dark reaction in photosynthesis of green plant cells is unknown, the name BLACKMAN-reaction merely means to indicate a non-photoc temperature sensitive process forming an essential part of the process of photosynthesis. From this point of view no objections can be raised against the use of the term „BLACKMAN-reaction" also in the case of purple sulphur bacteria. However the use of this term in our opinion should not be propagated, since it may cover different processes under different conditions.

We conclude this section with a table giving a survey of the ways in which various agents influence gas exchange and fluorescence by acting upon the three catalytic systems discussed in this paper (Table X).

### Summary.

Parallel measurements of gas exchange in photosynthesis and of fluorescence of bacterio-chlorophyll in suspensions of purple sulphur bacteria, *Chromatium*, strain D, are described. They were performed in order to investigate to which extent bacterio-chlorophyll is involved also in the further utilization of the absorbed light energy.

The gas exchange shows the same relation to the incident intensity of light as in green plant cells, indicating that the process of photosynthesis also here contains light-sensitive and light-insensitive links.

The curves of fluorescence of bacterio-chlorophyll against the incident intensity of light are bent curves, consisting of an initial slope, a transition range and a much steeper final slope. This indicates that the acceptor of the excitation energy of bacterio-chlorophyll is not present in abundance but only in a limited amount (*cf.* § 2). In a suspension free from hydrogen donors the transition between initial and final slope is situated at a low light intensity: upon supply of hydrogen donor it shifts towards a higher intensity, thus causing a decrease of fluorescence at high light intensities (§ 8). This decrease is also observed if only a very small rate of photosynthesis is allowed to take place, *e.g.*, in absence of carbon dioxide. So we conclude that the hydrogen donor is primarily connected with the transfer of energy. Above a certain concentration of hydrogen donor fluorescence is not influenced further; in the same region of concentrations also the rate of gas exchange shows saturation. We conclude that in the presence of excess of hydrogen donor a certain system becomes a limiting factor both for energy transfer and for photosynthesis. In the presence of an excess of hydrogen donor, the energy transfer and the rate of photosynthesis are in the same way dependent on temperature (§ 9). This indicates that the limiting system mentioned above is not the system of energy transfer as such, but an enzymatic reaction in which the hydrogen donor is involved. This implies that the hydrogen donor does not occupy the transfer system as such, but is transformed into an energy acceptor by the process mentioned (§ 8). This reaction moreover shows a marked sensitivity to pH, different for different hydrogen donors (§ 10). In experiments with simultaneous supply of hydrogen and thiosulphate the parts of the mentioned enzymatic system reacting with each of these two donors could be computed. At pH 6.3 and 29° they were about 68 % for thiosulphate and 32 % for hydrogen (§ 11). A discussion is devoted to the S-shape of curves representing the rate of photosynthesis, measured as uptake of carbon dioxide against incident intensity. Some evidence is presented that it is connected with photosynthesis at the expense of cellular hydrogen donors (§ 12).

Carbon dioxide appears not to interfere with the energy transfer (§ 14), neither does

TABLE X.  
Influence of various agents upon photosynthesis and fluorescence of bacterio-chlorophyll in suspensions of *Chromatium*, strain D.

§	Agent *	Curves of gas exchanged plotted against incident intensity				Curves of fluorescence plotted against incident intensity				Influence upon system of		
		max. slope	trans. pt. int.	saturation value	remarks	init. slope	trans. pt. int.	final slope	remarks	donor transform.	energy transfer	CO <sub>2</sub> reduction
8	limitation of hydrogen donor	independent	decrease	decrease	—	independent	decrease	independent	—	(1) limitation	(2) decrease of acceptor concentration	—
9	decrease of temperature	independent	decrease	decrease	—	independent	decrease	almost independent	—	(1)	(2)	(1?)
10	increase of pH from 6.3 to 7.6	independent	decrease (thiosulphate) — (hydrogen) increase	decrease (thiosulphate) — (hydrogen) increase	—	independent	decrease (thiosulphate) increase (hydrogen)	independent	—	(1)	(2)	?
14	limitation of CO <sub>2</sub>	almost undep.	decrease	decrease	—	independent	slight increase	independent?	secondary influence on trans. range	—	(2)	(1) limitation
15 16	addition of KCN or NH <sub>2</sub> OH low dosis.	almost independent	decrease	decrease	partial inhibition	independent	slight increase	independent?	"	—	(2)	(1) partial inhibition
15 16	addition of KCN or NH <sub>2</sub> OH high dosis	—	—	—	total inhibition	increase	disappeared	equal to init. slope	straight curve	?	(1) accepting all energy	(1) total inhibition
17 18	addition of urethane or NaN <sub>3</sub> low dosis	small decrease	almost independent	decrease	partial inhibition; pronounced S-shape	small increase	increase	independent?	„anti S“-shape	?	(1) accepting energy (more at low intensity)	(1) partial inhibition
17 18	addition of urethane or NaN <sub>3</sub> high dosis	—	—	—	total inhibition	increase	disappeared	equal to init. slope	straight curve	?	(1) accepting all energy	(1) total inhibition

\*) The influence of the agents is given in relation to what is observed under the following conditions: temp. 29°, pH 6.3, excess of hy-

cyanide (§ 15). As these agents strongly influence the rate of photosynthesis, we have to conclude to the existence of a second dark enzyme-system, in which carbon dioxide is involved, and which is sensitive to cyanide and also to hydroxyl amine (§ 16).

Sodium azide and ethyl urethane also affect the latter system and moreover compete with the normal energy acceptor at the transfer system (§§ 17, 18).

We have so to put in mind that the „BLACKMAN”-characteristics of the process of photosynthesis, observed in rate measurements of gas exchange, can be due to two different processes, viz., 1) a process in which the hydrogen donor is converted into a substance involved in the transfer of energy; it is sensitive to temperature and pH, insensitive to cyanide, and precedes the transfer of light energy; 2) a process in which carbon dioxide is involved and obviously reduced; it is sensitive to cyanide and hydroxyl amine (and presumably also to temperature) and follows the transfer of light energy (§ 19).

All experimental results are in accordance with the assumption that the first mentioned system is a dehydrogenase, reacting with the hydrogen donors as substrates. It is assumed that hydrogen is transferred from these substrates to a substance or to substances present at the transfer system, which thus become active as energy acceptors (§ 26).

From miscellaneous observations the following ones may be mentioned here. In cell-free extracts, containing the pigment-protein complex, fluorescence is hardly influenced by hydrogen donors; it indicates that the donor-transforming system is damaged in these preparations (§ 22). The yield of fluorescence has been determined under the conditions of our experiments; it amounts to ca. 0.1 % of the absorbed light energy (§ 24). Some preliminary observations on initial changes of fluorescence have been reported. The time course of fluorescence of *Chromatium* shows a general similarity with that of *Chlorella* (§ 25).

We wish to acknowledge here with deep appreciation the many stimulating suggestions we have received from the part of our late director, Professor L. S. ORNSTEIN, under whose enthusiastic daily direction the experimental part of this study has been performed.

1) E. C. Wassink, D. Vermeulen, G. H. Reman, E. Katz, *Enzymol.* **5**, 100 (1938). — 2) L. S. Ornstein, E. C. Wassink, G. H. Reman, D. Vermeulen, *Enzymol.* **5**, 110 (1938). — 3) E. C. Wassink, E. Katz, *Enzymol.* **6**, 145 (1939). — 4) J. G. Eymers, E. C. Wassink, *Enzymol.* **2**, 258 (1938). — 5) E. C. Wassink, E. Katz, R. Dorrestein, *Enzymol.* **7**, 113 (1939). — 6) C. B. van Niel, *Arch. f. Mikrobiol.* **3**, 1 (1931). — 7) C. B. van Niel, *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.* **3**, 138 (1935). — 8) C. B. van Niel, *Arch. f. Mikrobiol.* **7**, 323 (1936). — 9) H. Gaffron, *Bioch. Zs.* **269**, 447 (1934); *ibid.* **279**, 1 (1935). — 10) H. Gaffron, *Bioch. Zs.* **260**, 1 (1933); *ibid.* **275**, 301 (1935). — 11) F. M. Muller, *Arch. f. Mikrobiol.* **4**, 131 (1933). — 12) H. Gaffron, *Ann. Rev. of Biochem.* **8**, 483 (1939). — 13) R. Dorrestein, E. C. Wassink, E. Katz, *Enzymol.* **10**, 355 (1942). — 14) P. Pringsheim, *Handb. d. Physik.*, Bd. XXIII (1926). — 15) O. Warburg, E. Negelein, *Zs. physikal. Chem.* **106**, 191 (1923). — 16) D. Vermeulen, E. C. Wassink, G. H. Reman, *Enzymol.* **4**, 254 (1937). — 17) O. Warburg, *Naturwiss.* **14**, 167 (1926). — 18) E. C. Wassink, *Enzymol.* **10**, 257 (1942). — 19) C. S. French, *Jl. of gen. Physiol.* **20**, 711 (1937). — 20) E. Katz, E. C. Wassink, R. Dorrestein, *Enzymol.* **10**, 269 (1942). — 21) E. Katz, E. C. Wassink, *Enzymol.* **7**, 97 (1939). — 22) E. C. Wassink, *Rec. trav. bot. néerl.* **31**, 583 (1934). — 23) H. P. Bottelier, *Rec. trav. bot. néerl.* **32**, 287 (1935). — 24) K. Wohl, *The new Phytol.* **39**, 33 (1940). — 25) C. S. French, *Jl. of gen. Physiol.* **23**, 483 (1940). — 26) R. Emerson, L. Green, *Plant Physiol.* **13**, 157 (1938). — 27) H. Gaffron, *Biol. Zbl.* **59**, 302 (1939). — 27a) H. Gaffron, *Amer. Journ. of Bot.* **27**, 204 (1940). — 28) J. Franck, K. F. Herzfeld, *Jl. of Chem. Phys.* **5**, 237 (1937). — 29) C. Bohr, *Wied. Ann. d. Phys. u. Chem.* **68**, 500 (1899). — 30) W. E. Adeney, H. G. Becker, *Philos. Magaz.* **39**, 385 (1920). — 31) A. Hagenbach, *Wied. Ann. d. Phys. u. Chem.* **65**, 673 (1898). — 32) G. Tammann, V. Jessen, *Zs. Anorg. Chem.* **179**, 125 (1929). — 33) H. Kautsky, *Bioch. Zs.* **274**, 435 (1934). — 34) C. B. van Niel, *Bull. Assoc. Microb. Fac. d. Pharmacie de Nancy*, 1936, No. 13. — 35) H. Nakamura, *Acta phytochim.* **9**, 189 (1937). — 36) E. A. Hanson, *Rec. trav. bot. néerl.* **36**, 183 (1939). — 37) R. Emerson, W. Arnold, *Jl. of gen. Physiol.* **15**, 391 (1932). — 38) O. Warburg, *Bioch. Zs.* **166**, 886 (1925).

# Theoretical considerations concerning the relation between photosynthesis and fluorescence of bacterio-chlorophyll in purple sulphur bacteria, with an outlook on the comparative physiology of photosynthesis

BY

R. DORRESTEIN, E. C. WASSINK AND E. KATZ

(*Biophysical Research Group under the Direction of L. S. Ornstein* †, Utrecht,  
and of *A. J. Kluyver*, Delft)

With 3 figures.

11th Communication on Photosynthesis \*).

(24.XII.41)

## § 1. Outline of situation.

In this paper we will try to connect the experimental data regarding photosynthesis and fluorescence of bacterio-chlorophyll in purple sulphur bacteria, described in the preceding paper (1), with our views concerning the mechanism of photosynthesis, formerly deduced from observations on the green cells of the alga *Chlorella*.

In order to facilitate the discussion, the general situation found in *Chlorella*-photosynthesis will be briefly summarized here.

It was remarked before (2, 3) that since long two possible explanations for the mechanism of chlorophyll action have been put forward, *viz.*,

1) chlorophyll itself takes part in a chemical reaction.

2) chlorophyll transfers the energy of excitation received by light absorption, to another compound, which is the first substance involved in chemical reactions (sensitizer-action of chlorophyll).

It may be recalled that the second possibility has already been suggested a long time ago, *e.g.* by ENGELMANN in 1888 (4); in recent times it has been considered again by various authors, *a.o.* by GAFFRON (5). However, since the fundamental chemical work on chlorophyll of WILLSTÄTTER and STOLL (6), most mechanisms of photosynthesis suggested have been founded upon the view of these investigators that carbon dioxide should react in photosynthesis in complex binding with chlorophyll, which implies that chlorophyll is directly involved in all chemical reactions.

Our observations on the rate of photosynthesis and the course of fluorescence in relation to the incident intensity of light in suspensions of *Chlorella* led us to the conclusion that a participation of chlorophyll in the chemical reactions of photosynthesis is improbable, and that a mechanism in which chlorophyll acts as a sensitizer has to be adopted. The chief argument for this conclusion was furnished by the observation that the yield of fluorescence and thus also the energy transfer from the chlorophyll did not alter appreciably in the region of light saturation for gas exchange. Moreover this suggested that in *Chlorella* even an indirect linkage between the reduction of CO<sub>2</sub> and the energy transfer is absent, so that the energy acceptor — the compound to which chlorophyll transfers its excitation energy — had to be postulated to be present in abundance. This implies that the time necessary to replace a „used” molecule of energy acceptor by a „fresh” one, is very small. This mechanism enables to explain the observation that agents influencing the BLACKMAN-reaction do not affect fluorescence at least in so far as not very strong effects are involved. On the contrary, agents influencing the „photic” part of

\*) 10th Comm.: Enzymol. 10, 285 (1942).

the process of photosynthesis affect fluorescence and may be considered to interfere with the process of energy transfer. In *Chlorella* such an action was found for urethane and for oxygen.

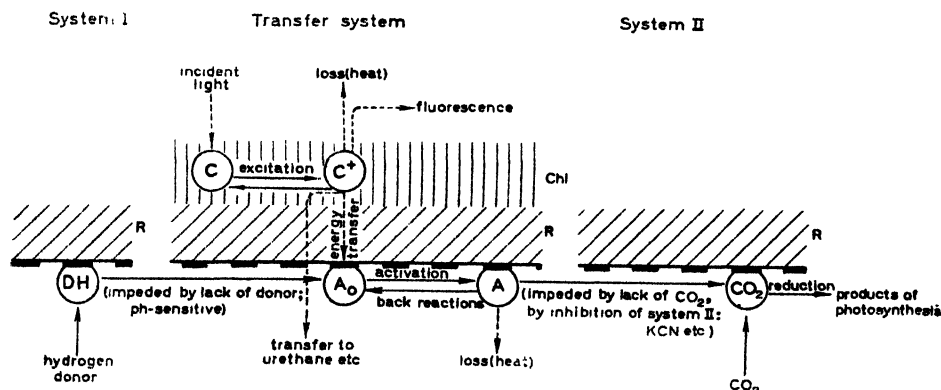
Further observations led to the conclusion that the energy acceptor must be considered to be a compound of the type  $\text{RHOH}$ , furnishing a reducing substance ( $\text{RH}$  or  $\text{H}$ ), reacting with  $\text{CO}_2$  in the BLACKMAN-reaction.

We will now consider in how far our observations on purple sulphur bacteria can be understood along similar lines. The relation of gas exchange to incident light intensity is much the same as in green cells; a light-sensitive and a light-independent part can be distinguished. However, a difference is observed in the fluorescence-irradiation curves, these being distinctly curved in the case of purple sulphur bacteria, whereas they are straight in *Chlorella*.

As was expounded in the preceding paper (1), under various conditions the attainment of light saturation of photosynthesis and the bend in the fluorescence curve occur at the same incident intensity as far as sufficient amounts of hydrogen donor and of carbon dioxide are present. In these cases there is no direct reason for postulating a mechanism including energy transfer, since a coupling between fluorescence and gas exchange, and thus between the energy transfer from bacterio-chlorophyll and the rate of photosynthesis is observed, which could also be reconciled with a mechanism, postulating bacterio-chlorophyll to be chemically involved in the entire process (*cf.* above). But other observations distinctly point against such a participation. Thus we have seen that the coupling between photosynthesis and fluorescence is disturbed *e.g.* when  $\text{CO}_2$  is not sufficiently available. Only in so far as the supply with hydrogen donor limits the rate of photosynthesis, coupling is observed. This means that bacterio-chlorophyll cannot be considered to be chemically connected with the process of photosynthesis and thus only a mechanism including an act of energy transfer can be considered.

The existence of a transition point intensity in the fluorescence curve has suggested that the energy acceptor in purple sulphur bacteria is not present in abundance but is formed from the hydrogen donor in an enzymatic reaction of limited capacity. Obviously a coincidence in the attainment of light saturation of gas exchange and fluorescence means that then the same reaction limits both the energy transfer and the rate of photosynthesis. The general conclusion has been that the limiting reaction is not the act of energy transfer as such, but that this transfer is only indirectly limited by a lack of energy acceptor.

These aspects of the mutual relation between the rate of photosynthesis and the intensity of fluorescence of bacterio-chlorophyll in purple sulphur bacteria have led us to postulate the following diagram for the mechanism of photosynthesis in these bacteria.



Diagram, showing the chief steps of photosynthesis in purple sulphur bacteria, according to the results of the combined study of gas exchange and fluorescence. The active compounds have been placed in circles, without implying anything concerning their chemical nature. R = proteins of the catalytic systems involved, c = bacterio-chlorophyll, c<sup>+</sup> = activated bacterio-chlorophyll, DH = hydrogen donor, A<sub>0</sub> = energy acceptor, A = activated energy acceptor; active spots of the catalytic systems indicated by thick stripes.

This diagram contains as a „skeleton” the diagram given earlier for photosynthesis of *Chlorella* (3), but is extended with the system I, reacting with the hydrogen donor.

At the system I from the hydrogen donor a substance is formed which takes part in the formation of an energy acceptor  $A_0$  at the energy-transfer system. Bacterio-chlorophyll is connected with the transfer system and here the energy of excitation which bacterio-chlorophyll receives by light absorption, is transferred to  $A_0$ , which thus changes into A, a compound active in the reduction of carbon dioxide. Possibilities for heat-losses and back reactions have been indicated in the diagram. According to the preceding paper, temperature and pH manifest themselves upon the rate of photosynthesis primarily by their action upon system I, cyanide and hydroxyl amine primarily by their action upon system II, whereas urethane and azide primarily attack the transfer system. Regarding the chief participants in the process we may remark that the hydrogen donors are considered to be involved in a reaction at system I, light is active at the transfer system, carbon dioxide is involved in a reaction at system II.

No doubt structural proteins are essential constituents of all these systems; they will have to be considered as indispensable with respect to the energy exchanges which take place in the reactions occurring at these systems (cf. § 9). In the picture the three active surfaces have been represented schematically along each other, but this does not imply any definite suggestion regarding their mutual topographic relation in the cell. Perhaps they occur mozaically in the same protein-layer; the only essential thing is that at the system I or „spots” I a dark reaction occurs with the hydrogen donor, at the transfer system or „spots” a photic reaction, at the system II or „spots” II a dark reaction with  $CO_2$ .

## § 2. Mathematical formulation of the main features of the assimilation process.

In this section we will show the possibility of a mathematical treatment of the chief features of the process of photosynthesis in purple sulphur bacteria, founded upon the principles outlined in § 1. We will consider especially the processes of supply and of activation of the energy acceptor  $A_0$  and of the annihilation of the state of activation A. We restrict ourselves to the stationary state of illumination and of gas exchange. Particular phenomena, occurring at very low light intensities, will be left out of consideration. The reader is requested to compare the analogous considerations for *Chlorella*, given in (3).

The same symbols will be used for the compounds involved and for their respective concentrations. So we denote with:

- $c$  = the number of unexcited molecules of bacterio-chlorophyll;
- $c^+$  = the number of excited molecules of bacterio-chlorophyll, to which the intensity of fluorescence is considered to be proportional in all cases;
- $A_0$  = the number of places at the transfer system, occupied by unexcited acceptor molecules;
- $d$  = the velocity of formation of  $A_0$ , connected with the conversion of a hydrogen donor at system I;
- $A$  = the number of activated acceptor molecules at the transfer system;
- $A_m$  = the maximum number of places at the transfer system, which can be occupied by  $A_0$  or by A;
- $v$  = the rate of assimilation in number of H-atoms used in photosynthesis, according to the equation  $CO_2 + 4H + 4h\nu \rightarrow CH_2O + H_2O$ ;
- $J$  = the energy absorbed by the bacterio-chlorophyll in number of quanta per unit of time, being proportional to the incident intensity.

In the formulae to be derived  $c^+$  represents also the intensity of fluorescence if expressed in arbitrary units,  $J$  represents also the incident intensity, expressed in arbitrary units.

The number of absorbed quanta per unit of time,  $J$ , determines the number of excited chlorophyll molecules  $c^+$  according to the formula:

$$\frac{dc^+}{dt} = J - \beta c^+$$

yielding for the stationary state:

$$J = \beta c^+ \quad \dots \dots \dots (1)$$

in which the coefficient  $\beta$  is a measure for the rate at which an excited bacterio-chlorophyll molecule can lose its energy. In general the fluorescence-irradiation curves are not straight lines through the origin, and thus, according to (1),  $\beta$  is dependent on  $J$ . This may be accounted for by assuming that at places occupied by  $A_o$  the probability for energy transfer is higher than at places without  $A_o$ . Thus we may divide  $\beta$  into two parts:

$$\beta = \beta_o + \beta_{A_o}$$

in which  $\beta_{A_o}$  represents the probability for energy transfer to the energy acceptor  $A_o$  whilst  $\beta_o$  represents the probability of energy transfer otherwise than to  $A_o$  and determines the rate at which the excited bacterio-chlorophyll can lose its energy when no energy acceptor  $A_o$  is present. This coefficient  $\beta_o$  again consists of two parts:  $\beta_{\text{heat}}$ , referring to all cases that the excitation energy is transformed finally into heat, and  $\beta_{\text{fluor}}$ , representing the probability for fluorescence.

As to the magnitude of these quantities the following can be remarked. According to PRINS <sup>(7)</sup> the „strength” of the transition corresponding to the red absorption range of chlorophyll is about 0.12. Assuming the corresponding constant in the case of bacterio-chlorophyll to be the same, for the spontaneous emission probability  $\beta_{\text{fluor}}$  the value  $10^7 \text{ sec}^{-1}$  can be calculated. Remembering that the yield of fluorescence as expressed by the ratio  $\beta_{\text{fluor}}/\beta$  is only about  $10^{-3}$  <sup>(1)</sup>, it follows that  $\beta \sim 10^{10} \text{ sec}^{-1}$  and that the mean life of excited bacterio-chlorophyll molecules is  $\sim 10^{-10} \text{ sec}$ .

The molar absorption coefficient of bacterio-chlorophyll for sodium light seems not yet to be known, neither in solution, nor in the living cell. However, the order of magnitude in both cases will not differ much from that for chlorophyll and for other similar substances in various solutions, and will not surpass  $10^4$ . Therefore, the „effective cross-section” for light absorption per molecule is at most  $\sim 10^{-16} \text{ cm}^2$ , and the absorption probability per molecule at our highest light intensity, being  $3.10^4 \text{ ergs/cm}^2 \text{ sec} = 10^{16} \text{ quanta/cm}^2 \text{ sec}$ , maximally amounts to  $\sim 10^{16} \times 10^{-16} = 1 \text{ sec}^{-1}$ .

This is some  $10^{10}$  times smaller than the rate of energy-loss per molecule and per sec.; so the conclusion is valid that the excited bacterio-chlorophyll molecules represent only a completely negligible fraction of the total amount of pigment. Therefore the number of absorbed quanta remains always strictly proportional to the incident intensity.

Assuming  $\beta_o$  to be a constant and  $\beta_{A_o}$  to be proportional to  $A_o$ , the total transfer probability becomes a linear function of  $A_o$ :

$$\beta = \beta_o + \alpha A_o \quad \dots \dots \dots (2)$$

By combination of (1) and (2) it follows that

$$J = \beta c^+ + \alpha A_o c^+ \quad \dots \dots \dots (3)$$

According to (3), at a given value of  $J$  the minimum value of  $c^+$  is:

$$c_{\min}^+ = \frac{J}{\beta_o + \alpha A_m} \quad \dots \dots \dots (4a)$$

in which  $A_m$  is the maximum number of places at the transfer system to be occupied by  $A_o$ . The maximum value of  $c^+$  is given by:

$$c_{\max}^+ = \frac{J}{\beta_o} \quad \dots \dots \dots (4b)$$

So all fluorescence-irradiation curves must lie between two straight lines *a* and *b* represented by the equations (4a) and (4b) respectively (fig. 1). For small values of  $J$  the transfer system will be fully occupied by  $A_o$ , and thus the „initial slope” of all fluorescence-irradiation curves will correspond to the minimum value of fluorescence and will therefore be described by (4a). For higher values of  $J$  the curves deviate from the initial slope, and tend to approach the slope given by equation (4b), due to a decrease of  $A_o$ ; equation (4b) will give the final slope observed in the experiments. In the absence of donor the fluores-

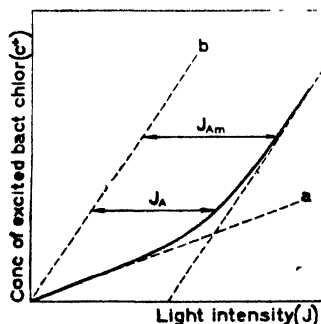


Fig. 1. Relation between  $c^+$  (concentration of excited bacterio-chlorophyll, being a measure for the intensity of fluorescence) and  $J$  (intensity of incident light).

cence-irradiation curves should obey equation (4b); in the experimental curves this is not realized exactly, possibly due to the influence of intra-cellular donors (1).

Evidently this scheme can be considered as an extension of that for *Chlorella*; in the latter case we have to assume that in the stationary state  $A_0$  is always equal to or approximately equal to  $A_m$ , which means that the „substance“  $A_0$  is present in abundance, so that straight lines appear for fluorescence as a function of the incident intensity.

Denoting with  $J_A$  the number of quanta per unit of time transferred to the acceptor  $A_0$  we obtain according to (8):

$$J_A = \alpha A_0 c^+ = J - \beta_0 c^+ \quad \dots \dots \dots (5)$$

(cf. fig. 1). Then, for the quantities  $A_0$  and  $A$  present in the stationary state the following equations hold:

$$d + f_1(A) = J_A \quad \dots \dots \dots (6)$$

and

$$J_A = f_1(A) + f_2(A) + v(A, \dots) \quad \dots \dots \dots (7)$$

At the left side of these equations we find the rate of formation of  $A_0$  and of  $A$  respectively, at the right side the rate of annihilation or disappearing of either of these compounds. The term  $f_1(A)$  represents the return of activated  $A$  to  $A_0$  at the transfer system, the term  $f_2(A)$  stands for other ways of annihilation of the activated state  $A$ , but not for those connected with photosynthesis; in both cases the excitation energy is ultimately transformed into heat. Both functions are zero for  $A = 0$ , and increase with  $A$ . The term  $v$  represents the annihilation of the activated state  $A$  as far as it is transferred to the system II; we may consider it at the same time as a measure for the rate of photosynthesis, neglecting for the present losses at system II which can arise owing to absence of  $CO_2$ , inhibition by cyanide, etc. The function  $v$  also will increase with  $A$ .

Combining the equations (6) and (7) we obtain:

$$d = f_2(A) + v(A, \dots) \quad \dots \dots \dots (8)$$

The simple equations (6) and (7) can already account for the features of the curves representing the relations of photosynthesis and fluorescence towards incident intensity under various conditions. As will be seen below, in some cases we need some further qualitative assumptions.

We will now consider firstly the action of the hydrogen donors, of the ph, and of different temperatures.

For low light intensities we assume that the affinity of the transfer system for  $A_0$  is sufficient to ascertain that  $d$  will be so large that the transfer system is kept fully occupied. In the beginning  $A$  will be negligibly small compared to  $A_0$ , so:

$$J_A = \alpha A_m c^+$$

which equation is equivalent to (4a). According to (7)  $A$  will increase with  $c^+$  and thus the rate of photosynthesis  $v$  will be an increasing function of the light intensity.

For the BLACKMAN-range we assume that the capacity of system I becomes limiting which means that  $d$  reaches a maximum value  $d_m$  and consequently the transfer system does not remain fully occupied. Furthermore we assume that  $v$ , like  $f_1$  and  $f_2$ , is a function of  $A$  only, and is not influenced by factors active at system II. Then, if  $d = d_m$ , according to equations (8) and (6), also  $A$ ,  $v$ , and  $J_A$  will reach constant values, thus:

$$d = d_m \rightarrow v = v_m, \text{ and } J_A = J_{Am}$$

This indicates that a constant assimilation value is connected with a linear relation between  $c^+$  and  $J$ :

$$J = J_{Am} + \beta_0 c^+ \quad \dots \dots \dots (9)$$

The straight course of the curves of fluorescence against incident intensity in the BLACKMAN-range is in this way duly accounted for.

Assuming  $v$  to be a function of  $A$  only, equation (7) expresses the general coupling between  $J_A$  connected with fluorescence according to (5), and  $v$  (assimilation), linked by the quantity  $A$ . It is evident that, if the assimilation-irradiation curve shows a bend anywhere, the fluorescence-



irradiation curve will show a bend at the same incident intensity, i.e. the transition points for both curves lie at the same intensity. From equation (7) it is obvious that in the BLACKMAN-range  $J_{Am}$  will increase correlated with increase of  $v_m$  (cf. (1)).

We now will give a more specified mathematical model, making more definite assumptions concerning the functions  $d$ ,  $f_1$ ,  $f_2$ , and  $v$ . Two cases may be distinguished:

I. For low light intensities we have assumed that  $d$  is sufficiently large to ascertain full occupation of the transfer system by  $A_o$  and  $A$ , only a small amount of the latter substance being present.

II. For high intensities  $d$  is assumed to reach a maximum value  $d_m$ , the transfer system is then only partly occupied.

We will neglect a transition range and assume either the one, or the other case to be realised, thus either

$$\begin{aligned} A_o + A &= A_m \\ d &= d_m \end{aligned} \quad \dots \dots \dots (10)$$

or

Furthermore we will assume  $f_1$  and  $f_2$  to be proportional to  $A$ :

$$f_1(A) = \gamma_1 A, \text{ and } f_2(A) = \gamma_2 A \quad \dots \dots \dots (11)$$

For the present we will also assume that  $v$  is proportional to  $A$ :

$$v = \kappa A \quad \dots \dots \dots (12)$$

The two cases may be dealt with separately.

I. The transfer system is fully occupied. We then have:

$$A_o + A = A_m \quad \dots \dots \dots (13^I)$$

II. The transfer system is only partly occupied;  $d$  has its maximum value  $d_m$ . Equation (6) is then specified to:

$$d_m + \gamma_1 A = J_A = \alpha A_o c^+ \quad \dots \dots \dots (13^{II})$$

For both cases (7) is converted into:

$$J_A = \alpha A_o c^+ = (\gamma_1 + \gamma_2) A + \kappa A \quad \dots \dots \dots (14)$$

From (12) and (14) a direct connection between  $v$  and  $J_A$  can be derived:

$$\frac{J_A}{v} = \frac{\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa}{\kappa} = \text{const.} \quad \dots \dots \dots (15)$$

In case I we obtain for the relation between  $v$  and  $c^+$  with the aid of (13<sup>I</sup>), (14) and (12):

$$v = \frac{\kappa}{\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa + \alpha c_2} \alpha A_m c^+ \quad \dots \dots \dots (16^I)$$

and in case II from (13<sup>II</sup>), (14) and (12):

$$v = \frac{\kappa}{\gamma_2 + \kappa} d_m = v_m \quad \dots \dots \dots (16^{II})$$

The corresponding formulae for  $J_A$  are to be found with the aid of (15) and (16) and become:

$$\text{Case I:} \quad J_A = \frac{\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa}{\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa + \alpha c^+} \alpha A_m c^+ \quad \dots \dots \dots (17^I)$$

$$\text{Case II:} \quad J_A = \frac{\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa}{\gamma_2 + \kappa} d_m = J_{Am} \quad \dots \dots \dots (17^{II})$$

The relation (15) also expresses that the values of  $c^+$  for the transition points of the gas exchange and fluorescence curves are the same.

For values of  $\alpha c_2 \ll \gamma_1 + \gamma_2 + \kappa$ , thus when case I holds, the formula (16<sup>I</sup>) assumes the simpler form:

$$v = \frac{\kappa}{\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa} \alpha A_m c^+ \quad \dots \dots \dots (18^I)$$

and likewise formula (17<sup>I</sup>) becomes:

$$J_A = \alpha A_m c^+ \quad \dots \dots \dots (19')$$

This formula is equivalent with (4a), representing the initial slope of the  $J - c^+$  curve. By combining (18'), (19') and (5) we find the initial slope of the curve representing the rate of photosynthesis against the incident intensity:

$$v = \frac{\alpha A_m}{\beta_0 + \alpha A_m} \cdot \frac{\kappa}{\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa} \cdot J \quad \dots \dots \dots (20')$$

Equation (20') gives an expression for the quantum efficiency; the number of H-atoms involved in photosynthesis per quantum absorbed is given by:

$$\frac{v}{J} = \frac{\alpha A_m}{\beta_0 + \alpha A_m} \cdot \frac{\kappa}{\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa}$$

We see that this yield is always smaller than 1, due to the loss-terms  $\beta_0$ ,  $\gamma_1$  and  $\gamma_2$ .

With increasing values of  $\alpha c^+$ , for which case I still holds, the curves of  $v$  against  $c^+$ , those of  $J_A$  against  $c^+$  and in minor degree also those of  $v$  against  $J$  will deviate down from the initial slopes, represented by (18'), (19') and (20') respectively. According to (16') and (17')  $v$  and  $J_A$  will finally reach the saturation values:

$$v = \kappa A_m, \text{ and } J_A = (\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa) A_m$$

However, long before this would occur, case II will become valid, owing to the limited supply of energy acceptor at the transfer system.

In fig. 2 theoretical curves for  $v$  against  $H$  and for  $c^+$  against  $J$  have been drawn, according to (16), (17) and (5), for 8 values of  $d_m$ , with suitably chosen values for the parameters (*cf* below).  $J$ ,  $v$ , and  $c^+$  have been given in arbitrary units, the units for  $v$ , for  $J_A$ , and for  $J$  being connected by equations (7) and (5).

From the number of quantities introduced and the number of equations by which these quantities are related, it appears that for 3 quantities an independent choice of the units is permitted, the other units following herefrom.

The unit for  $J$  is chosen so, that its range extends from 0 to 100 in our experiments. According to (5)  $J_A$  and  $\beta_0 c^+$  have to be expressed in the same unit. Corresponding units for  $d$ ,  $\gamma_1 A$ ,  $\gamma_2 A$ , and  $v = \kappa A$  are fixed by the equations (13II) and (14). Choosing the time unit so that  $\beta_0 = 1$ , the unit for  $c^+$  is fixed according to (4). Finally, choosing arbitrarily the unit for the „number of active spots at the transfer system” so that  $A_m = 100$ , the units for  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$ ,  $\kappa$ , and  $\alpha$  are fixed according to (14). For the constants determining the shape of the curves in fig. 2 the following values have been chosen:

$$\alpha = 0,03 \quad \kappa = 2 \quad \gamma_1 = 0,6 \quad \gamma_2 = 0,4$$

With these values

1) the ratio between the tangents of final slope and initial slope of the fluorescence-irradiation curves,  $\frac{\beta_0 + \alpha A_m}{\beta_0}$  becomes equal to 4, according to our experimental results;

2) the quantum efficiency, given by (20') neglecting losses at the system II assumes the value  $v/J = 3/4 \times 2/3 = 1/2$ , thus amounting to 8 quanta absorbed per mol  $\text{CO}_2$  assimilated, in agreement with our experimental data.

3) the hypothetical maximum value for  $J_A$  if case I would persist over the whole intensity range, which, according to (17') also determines the degree of curvature of the initial part of the fluorescence curve,

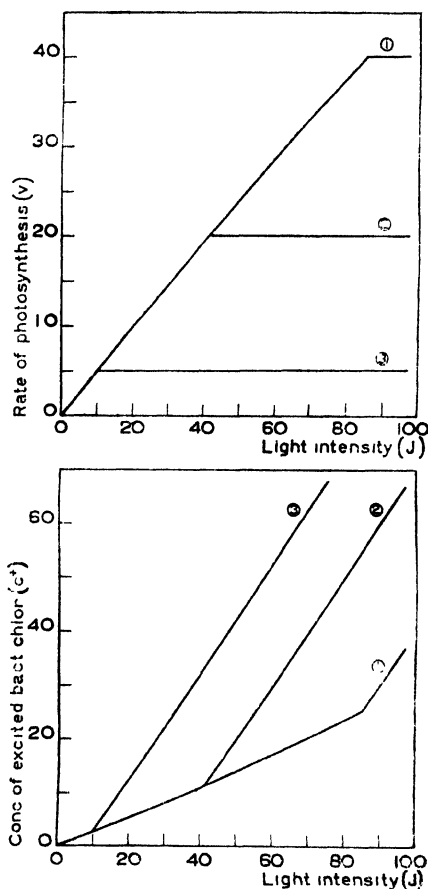


Fig. 2. Theoretical curves of  $v$  (rate of photosynthesis) against  $J$ , and of  $c^+$  against  $J$ , at three different rates of supply of energy acceptor,  $d_m$ , supposing that system I is limiting at high light intensities.

becomes  $(\gamma_1 + \gamma_2 + \kappa) A_m = 300$ , being a few times larger than the intensity range applied in our experiments.

Only the ratio  $\gamma_1 : \gamma_2$  which does not affect the shape of the curves, is rather arbitrary (*cf.*, however, *fig. 3*).

For  $d_m$  three values were taken, (*fig. 2*), *viz.*, 48 (curves 1), 24 (curves 2) and 6, (curves 3) corresponding to  $v_m = 40, 20$ , and 5, and  $J_{Am} = 60, 30$ , and 7.5 respectively.

In *fig. 2* the equality of the transition point intensities for gas exchange and for fluorescence is demonstrated. The situation described here holds for all cases that the capacity of the process of donor transformation constitutes the limiting factor for the rate of photosynthesis at high light intensities, causing a maximum value  $d_m$  for  $d$ , which value  $d_m$  is dependent on temperature, pH and quality or quantity of the donor. Variation of these agents by influencing  $d_m$ , therefore, causes simultaneous parallel shifts of the final straight parts of the gas exchange and fluorescence curves.

So far we have considered only the limited capacity of system I as being responsible for light saturation. Quite another situation is obtained when a reaction at system II becomes the limiting factor for photosynthesis. For the case of total inhibition of the assimilation by lack of  $\text{CO}_2$  or addition a sufficient amount of KCN we can derive the fundamental features of the behaviour of fluorescence already from the general model given by (6) and (7). We will distinguish also here the two cases mentioned above, *viz.* I: the transfer system is fully occupied by  $A_o$  and  $A$ , and II: it is only partly occupied since  $d$  has reached the maximum value  $d_m$ .

Case I. When in (7)  $v$  decreases to zero, we observe that for a given value of  $J_A$ ,  $f_1(A)$ , and  $f_2(A)$ , and thus also  $A$  will increase, and since the transfer system is fully occupied  $A_o$  will decrease. This decrease will be only very small, since at low light intensities  $A_o$  is large in relation to  $A$ . The decrease of  $A_o$  will cause a correlated increase of  $c^+$  according to (5) and thus the fluorescence will also rise a little.

Case II. When  $v$  decreases to zero, according to (8)  $f_2(A)$  and thus also  $A$  will increase, since in this case  $d$  has its maximum value  $d_m$ . Owing to the increase of  $A$  also  $f_1(A)$  will increase, and thus according to (6),  $J_A$ , being independent of  $c^+$  in this intensity range, will increase, causing a decrease of fluorescence at high intensities (*cf.* (1)).

This is a mathematical formulation of the considerations given in (1), § 14, in which however 3 cases were distinguished; the cases 1 and 2 have been taken together here as case I.

We will now try to express the situation obtaining with limitation at system II by an extension of the more specified mathematical model, introduced already above.

In order to obtain simple formulae we will represent the limiting action of system II by postulating the term for the rate of photosynthesis in (7) to be a constant. Thus:

$$\left. \begin{array}{l} v = 0 \\ \text{becoming valid as soon as } \kappa A \text{ reaches the value } 0, \text{ whereas} \\ v = \kappa A \end{array} \right\} \quad (21)$$

still holds for  $\kappa A \leq 0$

$O$  is a function of the capacity of system II, or, in the case of  $\text{CO}_2$ -limitation, it is directly connected with the rate of  $\text{CO}_2$ -supply at system II. The possibility  $v = \kappa A$ , dealt with above, will be denoted as case a, the possibility  $v = 0$  as case b.

Also for case b the cases I and II may be separated. If the assumptions (11) are left unaltered, we obtain:

$$\text{Case I} \quad J_A = \frac{\alpha c^+}{\gamma_1 + \gamma_2 + \alpha c^+} \left\{ (\gamma_1 + \gamma_2) A_m + O \right\} \quad (22a)$$

$$\text{Case II} \quad J_A = \frac{\gamma_1 + \gamma_2}{\gamma_2} d_m - \frac{\gamma_1}{\gamma_2} O = J_{Am} \quad (22b)$$

From (22) the formulae for total inhibition at system II can be derived by substituting  $O = 0$ :

$$\text{Case I} \quad J_A = \frac{\gamma_1 + \gamma_2}{\gamma_1 + \gamma_2 + \alpha c^+} \alpha A_m v^+ \quad \dots \dots \dots (23\text{I})$$

$$\text{Case II} \quad J_{Am} = \frac{\gamma_1 + \gamma_2}{\gamma_2} d_m \quad \dots \dots \dots (23\text{II})$$

The same formulae can be derived directly from (6), (7) and (11) by putting  $v = 0$ , and also from (17) by putting  $\kappa = 0$ .

For any situation excluded urethane and azide inhibition, so *e.g.* lack of  $\text{CO}_2$ , inhibition by cyanide or by hydroxyl amine, a suitable combination of the formulae (16), (17), (21), and (22), each in its own validity range, can describe in principle the shape of the gas exchange and fluorescence curves.

Fig. 3 shows as an example the change in shape of these curves when  $O$  is decreased, owing to inhibition by KCN.

The value of  $d_m$  has then been assumed to be equal to 24, corresponding to  $v_m = 20$ , that of  $O$  in the case of partial inhibition to be equal to 5, indicating an inhibition to 1/4. This inhibition occurs *e.g.* in fig. 47 of the preceding paper in the presence of 0.00167% KCN; the corresponding fluorescence curves are to be found in fig. 56, to which figure the theoretical curves under discussion thus have been adapted. To the other parameters used the same values have been given as in fig. 2, *viz.*  $\beta_0 = 1, \alpha A_m = 3, A_m = 100, \gamma_1 = 0.6, \gamma_2 = 0.4, \kappa = 2$ . Using these values we have constructed in fig. 3 a fluorescence curve for the case of non-inhibited photosynthesis (curve 1), a curve for totally inhibited photosynthesis (curve 3) and a curve in which an inhibition to 1/4 was assumed (curve 2). The experimental fluorescence curve in the case of total inhibition equals more the theoretical curve which is obtained when the value for  $A_m$  is assumed to be 82 instead of 100 (curve 4). This is consistent with our view that KCN in high concentrations also occupies part of the transfer system.

The conclusion is that the formulae developed are able to describe the observed phenomena satisfactorily, also when the effect of an inhibition has to be accounted for.

In the case of partial inhibition at system II the relation between  $c^+$  and  $J$  is expressed by formula (17<sup>1</sup>) in the intensity range below the transition point for the relation between gas exchange and  $J$ . Above this transition point the relation between  $c^+$  and  $J$  is expressed by formula (22<sup>1</sup>); the slope of the fluorescence curve then becomes somewhat higher, but so little that it is not visible in the plot.

A bend occurs in the theoretical fluorescence curves as soon as (22<sup>1</sup>) becomes valid. This bend shifts towards higher values of  $J$  when  $O$  decreases; in the theoretical curve for partial inhibition in fig. 3 it is situated at  $J = 86$ .

When the maximum capacity of system II is small and that of system I is large, the coupling of system II to the transfer system may be so important, that the latter system always remains fully occupied with  $A_0$  and  $A$ . Formula (22<sup>1</sup>) then will not hold at all; the condition for validity of (22<sup>1</sup>) being that the curves given by (22<sup>1</sup>) and (22<sup>1</sup>) intersect:  $d_m - O < \gamma_2 A_m$ .

In cases in which the capacity of system I constitutes the limiting factor in gas exchange it has to be supposed that for KCN inhibition a threshold value exists, for which a few experi-

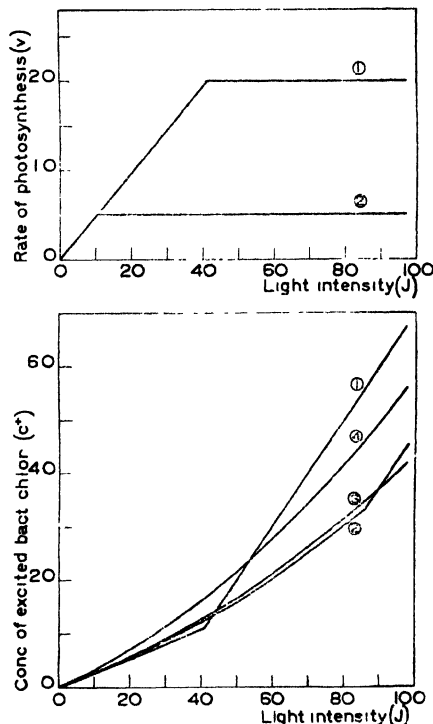


Fig. 3. Theoretical curves of  $v$  against  $J$ , and of  $c^+$  against  $J$ , demonstrating the influence of an inhibition at system II. Three cases: 1) no inhibition at system II (limitation by system I); 2) partial inhibition at system II; 3), 4) total inhibition at system II for two different values of  $A_m$  (*cf.* text).

mental indications were indeed obtained (*cf.* (1)). In our mathematical model this threshold is distinctly pronounced, since KCN will not exert any influence as long as  $O > \frac{\kappa}{\gamma_2 + \kappa} d_m$  (see (16II)).

A closer comparison of the experimental and the theoretical fluorescence curves in the case of strong inhibition at system II reveals that the former ones run somewhat straighter than the latter ones, also when an adequate correction is applied for the methodically imposed transition range (*cf.* (8)). This seems to indicate that the expressions (11) must be replaced by others. The shape of the experimental curves for total inhibition can be approached still better by that of the theoretical ones, assuming in (7) one of the loss-terms  $f_1(A)$ ,  $f_2(A)$ , or both to be a quadratic function of  $A$ . This assumption is physically well conceivable, when one interprets the loss-terms  $f_1(A)$  or  $f_2(A)$  as representing a recombination-process of free radicals.

The chief difference between the changes introduced into the fluorescence curves by agents acting at system II, and those introduced by agents active at system I is that when limitation of gas exchange by system II occurs,  $J_A$  goes on to increase with  $c^+$  after the gas exchange curve has passed its transition point intensity. This accounts for the fact that the experimental transition range for fluorescence becomes more continuous and the transition point indefinite.

As for the action of poisons like azide and ethyl urethane, it is not intended to give here an account for the rather complicated phenomena then observed. Only a few remarks may be made. From the experimental facts that the initial slope of the fluorescence-irradiation curve rises upon addition of these poisons, and that an inhibition of photosynthesis especially at low light intensities occurs, it was already concluded that the main influence of these poisons exists in a blocking of the transfer system, so that the number of places accessible for the energy acceptor active in photosynthesis is diminished. It must be conceived that the total transfer probability  $\beta$  then is composed of three parts:

$$\beta = \beta_o + \beta_p + \beta_{A_o} = \beta_o + \beta_p + \alpha A_o \quad \dots \dots \dots (24)$$

in which  $\beta_p$  refers to the direct transfer to the poison. The influence of azide and urethane can be represented by substituting a larger value for  $\beta_o$  and a smaller value for  $A_m$  in the various formulae obtained; it must, however, be taken into account that in that case  $\beta_o$  and  $A_m$  are no longer necessarily independent of the incident energy  $J$ . Assuming that  $\beta_p$  is smaller than the corresponding decrease of  $\alpha A_m$ , it is clear that the maximum value of  $\beta$ , reached when all available places have been occupied either by  $A_o$  or by the poison, is lower in the presence of poison than in its absence. Therefore, the initial slope of the fluorescence-irradiation curve will rise. Moreover, according to (24), the decrease of the fraction of the incident light energy that is accepted by  $A_o$  and used in photosynthesis will cause an inhibition of the rate of photosynthesis at low intensities. For medium intensities it must be assumed that the occupation of the transfer system by the poison becomes somewhat smaller, causing an increase of the value for  $A_m$  which has to be substituted in (16<sup>1</sup>) and (17<sup>1</sup>), and leading to correlative bends of fluorescence and gas exchange curves (*cf.* (1)).

It is obvious that, according to the assumptions (10) and (21), in our model sharp bends appear in the curves of photosynthesis and of fluorescence against incident intensity instead of the transition ranges experimentally observed. In our paper on *Chlorella*-photosynthesis (3) we accounted for the occurrence of such a transition range by putting that the rate at which the activated energy acceptor can react at system II is proportional to the number of places at system II occupied with carbon dioxide and its reduced states and moreover to the concentration of activated energy acceptor  $A$ , whereas at high light intensities the removal of the final product from the system II limits the reaction velocity.

In principle similar assumptions could be made in the present paper; these would cause that the rate of photosynthesis reaches its BLACKMAN-value only asymptotically, instead of, according to (21), immediately above the transition point between light limitation and light saturation. Such suppositions would, moreover, cause the sharpness of the threshold for KCN-inhibition to disappear; a small influence of KCN would occur also at low light intensities, as

was actually observed in our experiments. Another specified assumption, which was made in our paper on *Chlorella* is the introduction of a more-step-mechanism at system II, but this introduction would have no essential influence on the formulae obtained.

In the present paper we have omitted all such more detailed suppositions concerning the reaction mechanism at system II since it was our aim to keep the formulae as simple as possible in order to demonstrate clearly which factors are actually active in determining the shapes of the curves. Moreover, we have seen in (8) that it is difficult to know from experiments with a cell suspension to what extent a transition range actually occurs in the single cell. In this connection it can be remarked that the conclusions drawn by SMITH<sup>9)</sup> from the apparent shape of the transition ranges in different cell samples are open to objections.

By the way it can be stated that the supposition that the rate of supply of the energy acceptor at the transfer system would only be proportional to the number of empty places, thus  $d = \rho(A_m - A_o - A)$ , with  $dm = \rho A_m$ , does not yield good results. This supposition would be plausible, if it is assumed that the limiting reaction of donor transformation would occur at the transfer surface itself. Together with the assumptions (11), (12), this supposition would yield curves of photosynthesis and of fluorescence against incident intensity, which are more rounded than the experimental ones.

The exposé given in this section may have demonstrated that, founded upon the views outlined in § 1 and in the preceding paper, with the introduction of a few simple assumptions and a limited number of constants, simple mathematical formulae can be developed, which are able to describe the fundamental features of the behaviour of gas exchange and fluorescence in photosynthetic of purple sulphur bacteria.

### § 3. General survey; outlook on the comparative physiology of photosynthesis.

We have seen in the preceding sections that both qualitatively and mathematically the observations on photosynthesis and fluorescence in purple sulphur bacteria can be condensed in a scheme which is founded upon the same principles as the one previously developed from our observations on photosynthesis and fluorescence in *Chlorella*. The common feature of both schemes is the supposition of an energy transfer from the photoactive pigment; the rôle of the latter is thus restricted to that of a sensitizer. Due to this transfer of energy the energy acceptor is enabled to exert a reducing action upon carbon dioxide and its reduced derivatives finally leading to the formation of carbohydrate. It is perhaps useful to expound firstly the principal points in which the part of our scheme mentioned so far differs from other concepts proposed in recent years and what are the reasons for these differences. Part of these points have already been dealt with previously in our paper on *Chlorella* and in § 1, and will only be mentioned briefly.

The reasons why we cannot accept a bond between chlorophyll and compounds engaged in chemical reactions have been discussed previously. They exclude schemes like those of WILLSTÄTTER and STOLL, of WILLSTÄTTER and of FRANCK and HERZFELD and also the scheme of VAN NIEL at least in its formulation of 1935, and finally also the optical model of the photosynthetic unit, proposed by GAFFRON and WOHL (cf. 3)). The scheme as formulated above and its consequences as far as fluorescence of *Chlorella* is concerned could be reconciled with the idea presented by WOHL as „kinetic model” of the photosynthetic unit; we were forced to a similar basic concept from our observations on *Chlorella*, especially because it turned out to be necessary to introduce an energy acceptor „present in abundance” (cf. 3)). But also if the energy acceptor can no longer be postulated to be present in abundance as holds for the purple sulphur bacteria studied by us, the principles of the scheme need not to be altered. On the contrary, as was already outlined in § 1, various reasons speak in favour of a mechanism including an energy transfer also in this case. It may be useful to remark that this by no means implies that the energy acceptor is stoichiometrically related to the pigment or that the molecules of the energy acceptor are bound to the pigment molecules.

In order to specify the concept we may assume that the molecules of chlorophyll and of bacterio-chlorophyll are bound to a structural protein, presumably in a monolayer and then perhaps packed in the way found by HANSON<sup>10)</sup>. But there must exist still a much closer con-

tact with the protein, as follows from the shift of the red resp. infrared absorption band of the naturally occurring pigments as compared with the situation in extracts, which shift points to the existence of a direct protein-bond. This bond seems to be stronger in the case of bacteriochlorophyll and also in the case of bacterio-*viridine* than with ordinary chlorophyll since in the first cases the shift in the absorption band is much larger (11). The nature of the bond is unknown; at any rate the behaviour of the absorption indicates the existence of a complex the energetic properties of which are definitely altered by the protein (*cf.* also SCHEIBE 12)).

In the kinetic model of the photosynthetic unit the only sensible meaning of the unit is that of a reaction area. Whether the energy of a given quantum of light absorbed by the chlorophyll can be used for the reduction of a given molecule of carbon dioxide depends upon the probability that this amount of energy has to reach the molecule under consideration. In such a probability two steps can be distinguished. Firstly a given molecule of chlorophyll will only be able to transfer its energy to a certain group of acceptor molecules. Secondly a given molecule of energy acceptor will only be able to react with a certain group of carbon dioxide molecules or their reduced derivatives. If for a moment we retain the unit picture in its structural form and consider a carbon dioxide molecule as its „center” this implies that one cannot tell definitely whether a given molecule of chlorophyll belongs to a given unit or not. To which unit a molecule of chlorophyll belongs is only certain, so to say, for the molecules in the centre of this unit, whereas those at the sides will, dependent on various conditions, belong to the unit under consideration or to neighbouring ones.

We will now consider in some greater detail some factors determining the mentioned reaction area's. The discussion of the first step, *viz.*, at what distance an absorbed quantum may still be transferred, requires a specification of the mechanism of energy transfer. We may assume the energy acceptor to be present at the same structural protein at which the pigment is bound, and which forms an essential part of the „transfer system” (*cf.* § 1). The energy absorbed by a certain chlorophyll molecule may migrate to the energy acceptor in principle along two ways, *viz.*, through the pigment layer or through the protein. The migration through the pigment layer could be such as has been conceived for the migration of excitation energy in crystals, *e.g.* in those of silver halogenides. GAFFRON 13) has deemed this type of energy migration improbable in the case of the photosynthetic unit, since he considers the special properties found by SCHEIBE 12) in certain dye-complexes to be essential for the possibility of energy transfer along this way. It would occur to us, however, that especially in view of the situation in the silver halogenide crystals, this way of energy transfer needs not to be fully excluded. On the other hand the energy quantum may, directly, or indirectly after a migration through the pigment layer, pass to the protein and migrate here in some form to the energy acceptor. One might suggest that this form is that of a migrating electron. It is conceivable that an electron, mobilized by the absorption of a quantum in the chlorophyll, joining the energy acceptor changes an H-ion into a radical, which radical then is active in the reduction of CO<sub>2</sub>.

In the past years we had got used to the idea that theoretically 4 quanta of light are necessary and sufficient to reduce a molecule of carbon dioxide in photosynthesis and that moreover at least in green plant cells the rôle of each quantum is to split a water molecule into H and OH, or at least a bound water molecule into H and ROH, 4 H atoms then reducing a molecule of carbon dioxide. Quite recently we have learned with astonishment from a review by FRANCK and GAFFRON 14) that American investigators believe at present that not less than 12 quanta are necessary to reduce a molecule of carbon dioxide in the normal course of photosynthesis. FRANCK already goes so far as to elaborate a theoretical model in which 8 quanta are involved. These authors appear to reject EICHHOFF's results (15), which we, however, should not like to ignore, the more so since some incidental observations of our group have yielded efficiencies of 1 : 5 to 1 : 9 in *Chlorella* even without severe precautions being taken as to obtain the most active cells (2). Later on we have been able to confirm these results, and found that with *Chlorella* in WARBURG-buffer No. 9, at 29°, at least efficiencies of about 1 : 6 are obtainable in experiments of prolonged duration, in sodium light intensities which allow definitely positive readings. With this state of affairs it is of no great use to deal in further detail with the energy

exchanges in photosynthesis and to the possible amounts of energy involved in the various steps.

However, one general remark concerning the energy exchanges in photosynthesis must be added. Up to the present time it has in our opinion not been sufficiently realized that parts of the energy involved in the process are or at least may be conceived to be supplied in advance by structural elements of the cell. This will hold in the first place for all energy exchanges involved in reactions preceding the entrance of the light energy into the process. This statement would imply that the light energy or compounds formed with the aid of the light energy do not act upon the stable substrates, furnished from outside, but upon compounds, already pretreated or prechanged by the action of catalytical surfaces within the cell. We now know this to be the case for carbon dioxide in green plant cells, according to the experiments of RUBEN <sup>16)</sup> and to earlier evidence in this field, and for the hydrogen donors in purple bacteria, according to our observations. If we retain the 4-quantum-concept (p. mol. CO<sub>2</sub>) for the action of light and the formation of hydrogen from „water” in green plants, we will have to assume an analogous pretreatment for this water at the system of energy transfer, since otherwise one quantum would not be able to set free a hydrogen atom. In other words, the remaining OH-group must be strongly bound by the catalyst, and this binding energy is essential for the course of the process.

We may visualize that in the dark the various links of the process are already being prepared with the aid of energy available in the structural elements of the cell. The rôle of the light energy is to make a chain of these links. In first instance the requirements of thermodynamics are satisfied for the overall-process as soon as the amount of light energy in one cycle is sufficient to cover the energy raise of the system involved. It is evident that the energy immediately supplied by the catalytic surfaces must be restored. This may take place in reactions belonging themselves to the chain of photosynthesis, *e.g.* by production of oxygen from bound OH-radicals and similar conversions. But it may also partly be due to reactions not directly connected with photosynthesis at all, but belonging to the dissimilatory mechanism of the cell.

The necessity of restoration of the catalysts may be responsible for some recent observations according to which the efficiency of photosynthesis in the so called stationary state is in general lower than in the initial phase.

To summarize the considerations regarding the mechanism of energy transfer, as a whole this mechanism is considered to be of the „kinetic” type; an energy transport through the chlorophyll as such, however, not being excluded.

FRANCK and HERZFELD <sup>17)</sup> some years ago had tried to avoid the picture of the photosynthetic unit, assuming a separate connection of each chlorophyll molecule with the chemical reactions. Now again, FRANCK <sup>14)</sup> proposes a scheme of this type for new reasons amongst which the most forcing one is that evidence obtained in recent years should contain direct arguments against the existence of a photosynthetic unit. The most definite evidence was that the number of carbon dioxide molecules bound in green cells is comparable with that of the number of chlorophyll molecules and thus much larger than the number of reduction centers. The compound to which carbon dioxide is bound is, after the experiments of RUBEN *c.s.* <sup>17)</sup>, not chlorophyll itself. However, we cannot see that these facts speak definitely against any concept including a photosynthetic unit. For, it is by no means certain that each molecule of carbon dioxide is directly bound to an active reduction center, it is not even certain that the important introductory reaction under discussion means the binding of carbon dioxide to the catalyst at which also the reduction centers are found. And even if we accept that the compound to which CO<sub>2</sub> is bound is indeed the catalyst itself, we must keep in mind that its surface may be much larger than the area actually active in the reduction of CO<sub>2</sub>. To support this statement we only need to point to the difference in the order of magnitude of inhibiting concentrations generally existing between narcotics and specific poisons with respect to enzymatic reactions. Since WARBURG's considerations <sup>18)</sup> regarding these questions it has been adopted as the reason for this difference that narcotics exert an appreciable inhibition by covering the whole surface of the catalyst, thus removing the substrates of the reaction which are assumed to be normally present there. On the other hand specific poisons only need to occupy the relatively small number of active spots, in order to stop the reaction. It, therefore, appears well conceivable



that the capacity of the catalyst under consideration is much larger with respect to binding of the substrate carbon dioxide than its capacity of converting this substrate, and thus the observation mentioned above furnishes no direct evidence against the existence of only a limited number of active reducing centers.

A few words may still be said regarding specific requirements necessary to account for a quick start of photosynthesis and a good efficiency in a concept of the type of ours. We call in mind that according to our assumption each molecule of chlorophyll transfers the energy of an absorbed quantum independently of absorption acts in other chlorophyll molecules; directly or indirectly the energy reaches an acceptor molecule which then becomes able to furnish a reducing agent reacting with carbon dioxide. Each act of a chlorophyll-molecule and of an acceptor molecule is in principle independent of preceding and following acts. The reaction scheme at the transfer system may be considered to be the same for each quantum absorbed. The only place at which a more complicated reaction mechanism has to be supposed is at the system II (cf. § 1) at which carbon dioxide is reduced. Here each molecule of carbon dioxide must receive 4 hydrogen atoms in order to become converted into carbohydrate. This statement remains true also if one does not accept that 4 elementary reactions are sufficient to bring about this conversion in green plant cells; we may however take it for granted that the number of reactions is at least 4. Therefore the occurrence of a good efficiency requires that no much intermediate product is lost. This may be explained in two ways, viz., 1) by assuming that the intermediate products are stable, or 2) by assuming that they are quickly involved in the required subsequent reactions. The fact that photosynthesis becomes quickly stationary after the start of an illumination speaks in favour of the second possibility, unless it is assumed that intermediates present from a preceding illumination are practically infinitely stable. However, it would be difficult to reconcile such a stability with the required reactivity of these products. Moreover, we must keep in mind that according to the experiments of EMERSON and ARNOLD<sup>19)</sup> and the considerations of GAFFRON and WOHL<sup>20)</sup> the time of completion of a cyclus at the system reducing CO<sub>2</sub> is in the average only a few hundredths of a second at 25° C. We, therefore, have to consider how this quick completion is possible under the general assumptions of the kinetic type of the photosynthetic unit. In our opinion the assumption is needed that the intermediates are preferent over CO<sub>2</sub> in the reaction with the reducing agent furnished by the energy acceptor. If such a preference would not be present it is hard to imagine how a sufficiently quick total reduction of a molecule of carbon dioxide would be obtained, especially at low light intensities. A preference of intermediate 2 above intermediate 1 and so on needs not necessarily to be assumed with respect to the efficiency, but it is useful with respect to an explanation of the quick start of photosynthesis.

At present it is difficult to visualize in detail the mechanism of such a preference. Perhaps it shows characteristics similar to those of the growth of silver specks in the latent image of a photographic plate. Here the larger specks already formed have a greater probability to bind an electron than the smaller ones since in the latter the conditions are more favourable for dissociation (cf. (21)). In the same way in photosynthesis the preference of the intermediates might be explained. This should be seen as an equal average capturing of electrons by CO<sub>2</sub> and the various intermediates, the more reduced intermediates, however, having a decreased probability of releasing the electron again.

In the scheme of photosynthesis recently proposed by FRANCK and GAFFRON (l.c. p. 214) the capacity of the catalyst active in binding carbon dioxide, called „A”, is assumed to limit the rate of photosynthesis under some conditions. According to unpublished measurements of FRANCK, FRENCH and PUCK, mentioned in the quoted review (14), in leaves of *Hydrangea* such conditions would obtain. The insufficiency of the catalyst „A” causes fluorescence to rise, for which fact FRANCK accounts in supposing that the CO<sub>2</sub>-acceptor-complex constitutes the energy acceptor for the excitation energy of the chlorophyll. As was shown in the preceding paper, in purple sulphur bacteria we found no indications that CO<sub>2</sub> is connected with the transfer of energy. Only an indirect influence of CO<sub>2</sub> upon fluorescence was observed, which however corresponds with the type of change in fluorescence described for various agents in *Hydrangea*, viz., unaltered fluorescence at low and at high light intensities and increase at medium ones. This might suggest that also in *Hydrangea* the influence of the cyanide-sensitive catalyst is not a direct one. Unfortunately we have not yet sufficient data for *Chlorella* at our disposal, since so far we have investigated *Chlorella* only in WARBURG buffer. As long as correlative data do not exist it may not be definitely excluded that carbon dioxide reacts differently in green plant cells and in purple bacteria. Since however, the cyanide sensitivity also in green cells is attributed to the catalyst reacting with CO<sub>2</sub>, a fundamentally similar role of CO<sub>2</sub> in both types of organisms seems more probable. KAUTSKY<sup>22)</sup> did not observe an influence of suitable concentrations of carbon dioxide upon the fluorescence of leaves and also concludes that it is

not connected with the energy transfer. But we must be aware of the fact that the measure in which the effects of a certain agent become observable can depend strongly upon the relative amounts of the various catalysts involved in photosynthesis. Still very little is known of this relative distribution in the various plants that have been investigated; we know, however, especially from the work of GAFFRON<sup>23</sup>), that it may widely differ even in taxonomically closely related species.

Before passing to the discussion of the part of our scheme that so far has a special bearing on the photosynthesis of purple sulphur bacteria, we will still deal for a moment with a remark made by FRANCK and GAFFRON<sup>14</sup>) regarding our results obtained with *Chlorella*, and the schemes that are or are not excluded owing to these results. The mentioned authors remark that a scheme like that of FRANCK and HERZFELD<sup>16</sup>) in which the intermediate products are supposed to be very unstable and immediately fall back to a photosensitive state is reconcilable with our experimental results. The answer to this remark is that the supposed instability of the intermediate products has the meaning of the introduction of an energy acceptor in abundance and thus means a separation of the chlorophyll from the subsequent dark reactions in the same way as was advocated by us. If on the other hand such a separation would not be accepted, the postulated properties of the intermediate products would either cause that the subsequent dark reactions would never become limiting (as was indeed supposed by FRANCK and HERZFELD) or that the yield would always be very low, and perhaps both these consequences would obtain together.

In our scheme the points discussed so far are considered to be the same in green cells and in purple bacteria, as was already mentioned at the beginning of this section. On the other hand the experiments reported in the preceding paper enabled us to extend the scheme to the case of purple sulphur bacteria by a localisation of the action of the hydrogen donor. The chief feature of this action was that it is indispensable for the possibility of energy transfer, and we consider this influence to be definitely proved with the aid of the fluorescence measurements. It appeared that, from the preliminary conceptions regarding the mechanism of photosynthesis in purple bacteria, the one given by VAN NIEL in 1936<sup>24</sup>) answers most closely to the requirements of our experiments and therefore agrees best with our own views.

Two further questions may now briefly be discussed, *viz.*, in how far also this part of the chain of photosynthetic processes is represented in green plant cells, and in how far the views of other authors agree with or may be „translated” in terms so as to make them agree with the present conceptions. As to the first point we can only say that a reaction limiting the available amount of energy acceptor was so far not found in our experiments on *Chlorella*, and similar evidence regarding other green cells does not yet exist. The result obtained with *Chlorella* seems easily acceptable as soon as one regards water in a bound form as the energy acceptor in that case; one cannot well imagine that this acceptor should have to undergo a reaction beforehand or should ever be available only in a limited amount. The matter changes if carbon dioxide should prove to play a rôle in the transfer of energy, as was mentioned already above to be advocated by FRANCK *c.s.* But such a reaction can no longer be compared with the way of formation of the energy acceptor so far found in purple bacteria.

FRANCK and GAFFRON have suggested that the main difference between the mechanism of photosynthesis in green plant cells and in purple bacteria is, that in green plant cells photochemically built intermediate peroxides are split and removed with liberation of oxygen whereas in purple bacteria they are removed by reduction at the expense of the hydrogen donor. If we accept this formulation we will have to consider the intermediate peroxides as occupying the places at the system of energy transfer at which no acceptance of energy is possible (called „empty places” in § 2 of the present paper). For it has been proved by our fluorescence measurements that in purple sulphur bacteria the action of the hydrogen donors is necessary to establish or reestablish a situation at the transfer system so that transfer of energy is possible. Drawing the parallel in the case of *Chlorella* we so far can only say that the corresponding reaction, thus according to FRANCK and GAFFRON the splitting of a peroxide, does not limit the transfer of energy under the conditions of our experiments. This does not exclude that such a limitation may normally be realized in other green cells, the more so in view of the evidence that the relative capacities of various limiting systems may differ in various organisms.

We have seen that the energy transfer in purple sulphur bacteria is not directly sensitive to cyanide. As a rule the catalytic reactions are assumed to be cyanide-sensitive; in cases that a reaction of this type determines the energy transfer fluorescence would be expected to answer to cyanide in a way analogous to that observed for the influence of temperature and pH in purple sulphur bacteria. The catalyst responsible for the liberation of oxygen in green cells is called „C” by FRANCK and GAFFRON. They consider this catalyst not to be normally responsible for the influence of cyanide upon photosynthesis, but the catalyst A, leading to the primary binding of carbon dioxide. This reaction is supposed to connect carbon dioxide with an acceptor molecule, and the acceptor-carbon dioxide molecule is supposed to be involved in a photochemical reaction, so in terms of our conception carbon dioxide is supposed to be bound to the system of energy transfer. As was exposed in our experimental paper and also mentioned above, we have evidence against such a supposition in the case of purple sulphur bacteria. It will be evident from the above considerations that FRANCK and GAFFRON's term „intermediate peroxides” may be transported to our results on purple bacteria as far as they are considered to be the substrate of the reducing action of the hydrogen donors. It is however essential to consider these „peroxides” to inhibit directly the transfer of energy. Whether these intermediate products in green cells and in purple bacteria actually have the character of peroxides is, however, unknown.

If we summarize the survey of data issued from our own experiments and from those of various other authors, we may consider the existence of the following partial processes in photosynthesis to be fairly well established:

- 1) a light reaction including a transfer of energy, both in green cells and in purple sulphur bacteria;
- 2) a dark reaction in which carbon dioxide is bound, in green cells;
- 3) a dark reaction in which carbon dioxide is reduced, both in green cells and in purple sulphur bacteria;
- 4) a dark reaction involving the hydrogen donor, essential for the energy transfer to the reactive system, in purple sulphur bacteria;
- 5) a reaction leading to the liberation of oxygen, in green plant cells.

It remains to be established in how far the reactions 4) and 5) replace each other at the transfer system in green cells and in purple bacteria according to the recent views of FRANCK and GAFFRON, and also in how far carbon dioxide plays an analogous or a different rôle in both types of photosynthetically active organisms.

A few words may be said concerning the introductory changes of fluorescence after the start of an illumination. In general these changes consist in a quick „outburst” of fluorescence, followed by a quick decay, after which a slower rise and thereafter a still slower decay follow. In green plants this type of curves was first observed by KAUTSKY<sup>25)</sup> and his co-workers; we have studied it in detail under exactly established conditions with suspensions of *Chlorella* (26) in order to see in how far it could be explained upon the basis of the knowledge gained from the study of steady fluorescence and gas exchange. A correlated study of fluorescence and gas exchange in the initial stages of illumination has also since long been planned (26), and is now in progress. MYERS and Mc ALISTER<sup>27)</sup> carried out such a study with higher plants, and indeed found a close relationship between the induction phenomena of fluorescence and of gas exchange. KAUTSKY<sup>28)</sup> has laid much stress upon the rôle of oxygen in connection with the fluorescence phenomena, even going so far as to attribute to oxygen the rôle of the chief energy acceptor in the process of photosynthesis. Without accepting the latter conclusion we also found definite evidence for a fluorescence-decreasing action of oxygen in *Chlorella*. So it was tempting to explain, in accordance with KAUTSKY, the gradual decay of fluorescence after about ½ minute of illumination by the action of the oxygen developed in photosynthesis, and reversely, to connect a high fluorescence with a reduced state of the system of energy transfer (2, 26). Also FRANCK and GAFFRON<sup>14)</sup>, especially according to still unpublished observations of FRANCK, FRENCH and PUCK consider the induction phenomena of gas exchange and fluorescence to be

closely related, and they look upon the oxygen-liberating catalyst as the chief seat of the induction phenomena.

We wish to emphasize here that our preliminary observations on the initial changes of fluorescence in purple sulphur bacteria (1) show that the fluorescence-time-curves — perhaps apart from the first few seconds — have a great similarity with those obtained in green cells. This necessitates to consider the action of oxygen, at least as far as it determines the chief shape of the curve not to be exclusive. Therefore, as was already done in our paper on *Chlorella* (26), it is perhaps better to explain the fluorescence-phenomena in terms of oxido-reductive changes. One difficulty still remains, as was also already mentioned before (1). In *Chlorella* we were forced to relate high fluorescence to a reduced state and low fluorescence to a relatively oxidized one. Now we found in the study on steady fluorescence of purple sulphur bacteria that a reduced state is connected with a good energy transfer and thus with a low fluorescence, whereas a high fluorescence obviously corresponds with a non-reduced state. This is a discrepancy, and until further experiments have been made, we cannot decide whether the explanation, given for the induction phenomena in *Chlorella* is right or wrong.

Another useful line of approach to the study of the induction phenomena in photosynthesis has already been found in the measurement of bioelectric potentials. Especially the measurements of BLINKS and SKOW (29) may be mentioned in this connection. They followed the changes in acidity upon illumination with a glass-electrode and with reserve they consider these changes as being due to changes in uptake and production of carbon dioxide. Besides this they also attempted to follow the course of the oxygen production with the aid of a cathodally polarized platinum-electrode. The mentioned observations were made only with green plants: with leaves and with some large marine algae.

It seems important to study these and similar phenomena also in purple bacteria. So far in this respect only one preliminary observation is available, made by ROELOFSEN (30) in 1935. Although the initial changes were not recorded, it is obvious that here illumination causes an effective rise in the redox-potential of the suspension. This rise was about 60 millivolt, viz., from about — 120 millivolt in the dark to about — 60 millivolt in the light in the absence of externally added hydrogen donors. In the presence of thiosulphate a rise of about 120 millivolt, viz., from about — 120 to about 0 millivolt was recorded upon illumination. In relation with these preliminary results we wish to emphasize that a production of oxygen in these cases does not come into consideration to explain the rise of potential upon illumination, whereas besides this the highest rise is obtained in the case that a reducing substance was added. Since photosynthesis is allowed to proceed quicker in the last mentioned case it is plausible that the change in potential is anyhow connected with the production of an oxidized by-product in photosynthesis.

All investigators in the field of photosynthesis are convinced, we feel, that photosynthesis, pigment-fluorescence and bioelectric potentials are closely related and under many conditions show correlated changes. At present, however, the first task still seems to be to establish more definitely the connections that exist between these phenomena, and it occurs to us that it is dangerous to interpret changes in fluorescence or changes in bioelectric potentials directly into terms of changes in the rate of photosynthesis. Hereto we are not yet sufficiently acquainted with the causes of change in the mentioned phenomena, especially under the complicated conditions of the non-steady state. At present the chief difficulty no doubt lies in the development of a sufficiently quick, independent measurement of gas exchange. The use of accumulation-measurements with the intercalation of recovery-periods (cf. (26)) promises to give here the most satisfying results.

Anyhow for the connection of photosynthesis and fluorescence we have a preliminary survey of the conditions under which both phenomena are linked and of those under which they are not linked. Briefly this may be summarized as follows. In the stationary state of illumination a change in photosynthesis is accompanied by a change in fluorescence as soon as the reaction limiting photosynthesis is in some way connected with the transfer of energy from the pigment. If this is not the case a change in the rate of photosynthesis will not be accompanied

by a change in fluorescence-intensity. However, also a change in fluorescence may occur without a change in photosynthetic rate. As a rule this will only be realizable at high light intensities, viz., when photosynthesis is already limited by another process. A close examination of the relation between photosynthesis and fluorescence in the non-steady state still seems worth while notwithstanding the useful attempts already made, especially by MYERS and Mc ALISTER (27).

Some years ago an important discovery was made by GAFFRON (cf. 14)), viz., that certain algae are able to acquire a reduced state in which they may assimilate carbon dioxide with a simultaneous uptake of hydrogen, similar to what is known in purple bacteria. It is of great importance to establish in how far also the more intimate mechanism of this process is related to the process going on in purple bacteria, especially whether the hydrogen donor action in these cases is also connected with the transfer of light energy. To study this, fluorescence may again prove to be a helpful tool.

Summarizing the considerations presented in this paper we may state that at present a satisfactory brute mechanism for the course of photosynthesis in purple sulphur bacteria can be given, founded upon the combined study of gas exchange and fluorescence. As to the induction phenomena and the connection with green plant photosynthesis, however, a number of points of primary importance, remain to be elucidated.

### Summary.

Founded upon the correlative experiments on photosynthesis and fluorescence, and upon the discussions, presented in the preceding paper, a scheme describing the course of photosynthesis in purple sulphur bacteria has been developed (§ 1). It can be denoted as an extension of the scheme presented earlier for *Chlorella* photosynthesis (3) on the basis of an analogous study.

In § 2 a mathematical formulation of the ideas outlined in § 1 has been given, which also can be seen as an extension of the formulation given earlier for *Chlorella* photosynthesis (3).

In § 3 a general survey of data in connection with a discussion of recent literature and an outlook on the comparative physiology of photosynthesis has been given. It appears that in order to achieve a detailed connection between photosynthesis of purple bacteria and of green cells, important questions still have to be elucidated.

- 1) E. C. Wassink, E. Katz, R. Dorrestein, *Enzymol.* **10**, 285 (1942). — 2) E. C. Wassink, D. Vermeulen, G. H. Reman, E. Katz, *Enzymol.* **5**, 100 (1938). — 3) L. S. Ornstein, E. C. Wassink, G. H. Reman, D. Vermeulen, *Enzymol.* **5**, 110 (1938). — 4) T. W. Engelmann, *Bot. Ztg.* **41**, 17 (1883). — 5) H. Gaffron, *Bioch. Zs.* **264**, 251 (1933). — 6) R. Willstätter, A. Stoll, *Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure*, Berlin, (1918). — 7) J. A. Prins, *Nature* **134**, 457 (1934). — 8) E. Katz, E. C. Wassink, R. Dorrestein, *Enzymol.* **10**, 269 (1942). — 9) E. L. Smith, *Jl. of gen. Physiol.* **20**, 807 (1937). — 10) E. A. Hanson, *Rec. d. trav. bot. néerland.* **36**, 183 (1939). — 11) E. Katz, E. C. Wassink, *Enzymol.* **7**, 97 (1939). — 12) G. Schaebe, *Kolloid-Zs.* **82**, 1 (1938). — 13) H. Gaffron, *Ann. Rev. of Biochem.* **8**, 483 (1939). — 14) J. Franck, H. Gaffron, *Advances in Enzymology* **1**, 199 (1941). — 15) H. J. Eichhoff, *Bioch. Zs.* **303**, 112 (1939). — 16) S. Ruben, M. D. Kamen, W. Z. Hassid, D. C. Devault, *Science* **90**, 570 (1939). — 17) J. Franck, K. F. Herzfeld, *Jl. of Chem. Physics* **5**, 237 (1937). — 18) O. Warburg, *Über die katalytischen Wirkungen der lebendigen Substanz*, Berlin, (1928). — 19) R. Emerson, W. Arnold, *Jl. of gen. Physiol.* **15**, 391 (1932). — 20) H. Gaffron, K. Wohl, *Naturwiss.* **24**, 81 (1936). — 21) E. Katz, *Contrib. to the understanding of latent image formation in photography*, Thesis, Utrecht, 1941. — 22) H. Kautsky, *Bioch. Zs.* **277**, 250 (1935). — 23) H. Gaffron, *Bioch. Zs.* **292**, 241 (1937). — 24) C. B. van Niel, *Bull. Assoc. Microb. Fac. d. Pharmacie de Nancy*, 1936, No. 18. — 25) H. Kautsky, *Bioch. Zs.* **274**, 423 (1934). — 26) E. C. Wassink, E. Katz, *Enzymol.* **5**, 145 (1939). — 27) E. D. Mc. Alister, J. Myers, *Smithsonian Misc. Coll.* **99**, No. 6 (1940). — 28) H. Kautsky, *Bioch. Zs.* **291**, 285 (1937). — 29) L. R. Blanks, R. K. Skow, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **24**, 413, 420 (1938). — 30) P. A. Roelofs, *On photosynthesis of the Thiorhodaceae*, Thesis, Utrecht, 1935.





**L.A.R.I. 75**

INDIAN AGRICULTURAL RESEARCH  
INSTITUTE LIBRARY, NEW DELHI.

[illegible]